



**Marina Amaral Saraiva**

Licenciada em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

## **Quantificação de metais pesados e de *musks* sintéticos em produtos alimentares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira,  
Investigadora Principal, INSA

Co-Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, FCT/UNL

Vogal: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, INSA



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2014**





**Marina Amaral Saraiva**

Licenciada em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

## **Quantificação de metais pesados e de *musks* sintéticos em produtos alimentares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira,  
Investigadora Principal, INSA

Co-Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, FCT/UNL

Vogal: Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira, INSA



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2014**

### **Copyright – Marina Amaral Saraiva, FCT/UNL, UNL**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Para a elaboração da minha tese de mestrado reuni contributos de várias pessoas.

Desde o início do mestrado, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, este trabalho não teria sido possível.

À Professora Doutora Isabel Castanheira, orientadora da dissertação, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Ainda por estimular o meu interesse por novos conhecimentos e avanço na vida académica.

À Professora Doutora Paula Duarte, co-orientadora da dissertação, pelo acompanhamento na vida académica e pela total disponibilidade que teve para comigo, pelos ensinamentos, por todo o apoio e incentivo na elaboração desta tese.

À Professora Doutora Mathilde Monperrus, investigadora no laboratório de química analítica, França, pelos novos conhecimentos e estímulo na área da investigação. Muito estimulou o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor.

A todas as amigas que me acompanharam nas experiências em laboratório, Inês Coelho, Sandra Gueifão e Joana Cavalheiro, por todo o auxílio, pelo sentimento de confiança que depositaram em mim e pelas amizades.

Agradeço também à minha família: pai, mãe, irmão e namorado pela compreensão e paciência no decurso da elaboração da dissertação.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para o meu sentimento de satisfação na conclusão desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

## Resumo

O presente trabalho surgiu com dois objectivos principais: avaliar o grau de contaminação, por metais pesados, em produtos hortícolas de duas zonas diferenciadas e avaliar as diferenças de concentrações de *musks* em diferentes amostras biológicas.

Numa primeira fase, perante os resultados obtidos para os metais pesados nas duas zonas diferenciadas (Vila Nova de Mil Fontes e Carrasqueira) foi possível avaliar o risco de exposição das duas populações.

Os produtos hortícolas utilizados no estudo do grau de contaminação foram: alfaces, couves, batatas e tomates. Numa tentativa de identificar uma possível fonte de contaminação foi analisado igualmente a água utilizada para rega e o solo que rodeava a cultura. O método usado na determinação foi a espectrometria de massa acoplada a plasma induzido (ICP-MS). Foram analisados os seguintes elementos: Manganês, Arsénio, Cádmio, Cobalto, Cobre, Chumbo, Estrôncio, Níquel, Crómio, Selénio e Zinco. Houve grandes variações das concentrações dos elementos entre as duas zonas em que os hortícolas, água e solo foram colhidos. Em todas as amostras, os elementos maioritários foram o zinco, o manganês e o estrôncio. Nas culturas, o chumbo era o elementos que apresentava concentrações mais baixas. Para a água utilizada nas regas, a zona da Carrasqueira apresenta concentrações muito baixas comparando com a zona de Vila Nova de Mil Fontes. Todos os valores encontrados nas culturas, na água e no solo se encontram abaixo dos valores máximos legislados.

A análise de risco, revela situações de alerta, para um indivíduo da Carrasqueira e quatro indivíduos de Vila Nova de Mil Fontes, uma vez que para o arsénio a dose diária tolerável segundo a EFSA é de 0,30 µg/kg/dia e os valores encontrados foram 0,30; 0,33; 0,61; 0,42 e 0,34 µg/kg/dia, respectivamente.

A determinação de musks em amostras biológicas, como ostras e mexilhões, salmão (músculo, fígado e gónadas) e enguias de vidro, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) recorrendo ao método de QuEChERS revelou que o galaxolide e o tonalide foram os analitos maioritários em todas as amostras. De entre as amostras de ostras e mexilhões, as colhidas na ria de Aveiro apresentam concentrações muito superiores para o galaxolide e o tonalide, 13,4 e 2,1 ng/g respectivamente, que as outras analisadas. Nas análises de salmão foram tidas em conta duas zonas diferenciadas, Nivelles e Bidassoa. Perante os resultados, a zona de Bidassoa apresentou menor contaminação de musks nas amostras recolhidas. Por último as análises às enguias de vidro dopadas permitiu traçar a cinética de acumulação de *galaxolide* e *tonalide* por parte do organismo e por outro lado identificar o *galaxolidone*, metabolito resultante do *galaxolide*.

**Palavras – chave:** ICP-MS, metais pesados, produtos hortícolas, GC/MS, *musks*, QuEChERS, amostras biológicas

## Abstract

This work came up with two main objectives: to assess the degree of contamination by heavy metals in vegetables from two different areas and evaluate the concentrations of musks in different biological samples.

Initially, before the results obtained for heavy metals in the two marked areas (Vila Nova de Mil Fontes and Carrasqueira) it was possible to assess the risk of exposure of the two populations.

The vegetables used in the study of the degree of contamination were: lettuce, cabbage, potatoes and tomatoes. In an attempt to identify a possible source of contamination was also analyzed water used for irrigation and the soil surrounding cultures.

The method used to determine was Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) . The following elements were analyzed: Manganese, Arsenic, Cadmium, Cobalt, Copper, Lead, Strontium, Nickel, Chromium, Selenium and Zinc. There were large variations in the concentrations of elements between the two areas in which the vegetables, water and soil were collected. In all samples, the majority elements were zinc, manganese and strontium. In cultures, lead was the element which had lower concentrations. To the water used in irrigation, the area of Carrasqueira presents very low concentrations compared with the area of Vila Nova de Mil Fontes. All values found in the crops, water and soil are below the legislated maximum.

Risk analysis reveals situations of alert for an individual from Carrasqueira and four individuals from Vila Nova de Mil Fontes, once for arsenic the acceptable daily intake according to the EFSA is 0.30 µg/kg/ day and values were 0.30; 0.33; 0.61; 0.42 and 0.34 µg/kg/day, respectively.

The determination of musks in biological samples, such as oysters and mussels, salmon (muscle, liver and gonads) and glass eels, by Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) using the method of QuEChERS revealed that Galaxolide and tonalide were the majority analytes in all samples.

Among the samples of oysters and mussels, collected in the Ria de Aveiro presented much higher concentrations for Galaxolide and tonalide, 13.4 and 2.1 ng/g, respectively, than the other analyzed.

In the analysis of salmon were taken into account two different areas, Nivelle and Bidassoa. Given the results, the zone of Bidassoa showed lower contamination of musks in the collected samples.

Finally the analysis to doped glass eels allowed to trace the kinetics of accumulation of tonalide and Galaxolide by the organism and secondly to identify the galaxolidone, metabolite resulting from Galaxolide.

**Key words:** ICP-MS, heavy metals, vegetables, GC/MS, musks, QuEChERS, biological samples

## Índice Geral

Introdução.....	1
1. Quantificação de contaminantes químicos em produtos hortícolas .....	3
1.1. Introdução.....	3
1.1.1 Contaminação de Produtos Hortícolas com Metais Pesados .....	3
1.1.2 Efeito dos Minerais na Saúde.....	4
1.1.2.1. O Crómio .....	4
1.1.2.2. O Níquel .....	5
1.1.2.3. O Arsénio.....	5
1.1.2.4. O Cádmio.....	6
1.1.2.5. O Chumbo .....	7
1.1.2.6. O Zinco .....	7
1.1.2.7. O Manganês .....	8
1.1.2.8. O Selénio .....	9
1.1.2.9. O Cobre .....	9
1.1.2.10. O Cobalto .....	10
1.1.2.11. O Estrôncio.....	10
1.1.3 A Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS).....	11
1.1.4 Enquadramento e Objectivo do Primeiro Capítulo.....	12
1.2. Materiais e Métodos .....	14
1.2.1. Plano de Amostragem.....	14
1.2.2. Análise dos Metais e Metalóides por ICP-MS .....	16
1.2.2.1. Preparação das Amostras .....	16
1.2.2.2. Leitura das Amostras no ICP-MS.....	17
1.2.3. Questionários ao Consumo.....	20
1.2.4. Pressupostos para Tomada de Decisão na Análise de Risco.....	21
1.3. Resultados e Discussão .....	23
1.3.1. Resultados obtidos nas amostras de produtos hortícolas.....	23



1.3.2. Resultados obtidos nas amostras de água de rega .....	25
1.3.3. Resultados obtidos nas amostras de solo .....	26
1.3.4. Estudo da translocação dos metais na alface .....	29
1.3.5. Análise de Risco.....	31
2. Avaliação do grau de contaminação de diversos produtos do mar com fragrâncias ou <i>musks</i> .....	38
2.1. Introdução .....	38
2.2.1. Detecção de <i>Musks</i> -Sintéticos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS).....	42
2.2.2. Metodologias de preparação das amostras para detecção de <i>Musks</i> -Sintéticos por GC/MS .....	43
2.2.3. Enquadramento e objectivos do segundo capítulo .....	45
2.2 Materiais e Métodos .....	46
2.2.1. Produtos Químicos e Reagentes .....	46
2.2.2. Preparação das soluções padrão .....	46
2.2.3. Amostras Analisadas .....	47
2.2.4. Preparação das Amostras .....	48
2.2.5 Análise instrumental .....	49
2.2.6 Controlo de Qualidade .....	50
2.2.7. Desenvolvimento do Método .....	51
2.3. Resultados e Discussão .....	52
2.3.1 Validação do Método .....	52
2.3.1.1. Tipo de Solvente de Extração .....	52
2.3.1.2. Rácio Massa de Amostra/Volume de Solvente .....	54
2.3.1.3. Método de Limpeza .....	55
2.3.2. Quantificação dos <i>Musks</i> nas Várias Amostras Analisadas.....	56
2.3.2.1. Ostras e mexilhões .....	56
2.3.2.2. Salmão.....	58
2.3.2.2.1 Músculo de Salmão .....	58

2.3.2.2.2 Gónadas de Salmão.....	60
2.3.2.2.3. Fígado de Salmão .....	62
2.3.2.3 Ensaio com as Enguia de vidro .....	65
2.3.2.3.1 Enguias de Vidro.....	65
2.3.2.3.2. Água do Aquário.....	67
2.3.2.3.3. Factor de Bioconcentração (FBC).....	69
2.3.2.4. Efeito de Matriz.....	69
Conclusão e Perspectivas Futuras .....	71
Referências.....	72
Anexo I.....	83

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1. 1:</b> Codificação das amostras de hortícolas.....	15
<b>Tabela 1. 2:</b> Codificação das amostras de água e solo.....	15
<b>Tabela 1. 3:</b> Programa de digestão por microndas usado para a matriz hortícolas.....	16
<b>Tabela 1. 4:</b> Gama de trabalho na determinação de metais e metalóides no ICP-MS. ....	18
<b>Tabela 1. 5:</b> Parâmetros de controlo de qualidade.....	19
<b>Tabela 1. 6:</b> Condições operacionais do ICP-MS.....	20
<b>Tabela 1. 7:</b> Dados Analíticos - elemento por amostra.....	24
<b>Tabela 1. 8:</b> Dados analíticos da água de rega.....	25
<b>Tabela 1. 9:</b> Dados analíticos do solo em contacto com as culturas. ....	27
<b>Tabela 1. 10:</b> Quantificação dos elementos minerais na parte foliar e raiz de alfaces, bem como no solo colhido nas mesmas zonas. ....	29
<b>Tabela 1. 11:</b> Factor de bioconcentração em diferentes alfaces por elemento. ....	30
<b>Tabela 1. 12:</b> Indivíduos em situação de alerta por ultrapassarem o limite máximo tolerável de arsénio. ....	33
<b>Tabela 1. 13:</b> Compilação dos valores máximos e mínimos de EDI ( $\mu\text{g/kg/dia}$ ) nos dois cenários traçados e variações de peso das crianças e adultos na zona da Carrasqueira. ....	36
<b>Tabela 1. 14:</b> Compilação dos valores máximos e mínimos de EDI ( $\mu\text{g/kg/dia}$ ) nos dois cenários traçados e variações de peso das crianças e adultos na zona de Vila Nova de Milfontes. ....	37
<b>Tabela 2. 1:</b> Identificação e caracterização dos cinco nitro- <i>musks</i> mais comuns.....	39
<b>Tabela 2. 2:</b> Identificação e caracterização dos seis <i>musks</i> -policíclicos mais comuns. ....	40
<b>Tabela 2. 3:</b> Organismos aquáticos em que foi detectada a presença de musks e respectiva concentração....	41
<b>Tabela 2. 4:</b> Descrição das várias amostras analisadas .....	47
<b>Tabela 2. 5:</b> Condições do PTV-GC/MS usadas para a análise.....	49
<b>Tabela 2. 6:</b> Caracterização do composto a analisar com o tempo de retenção, m/z do ião alvo e dos qualitativos .....	50
<b>Tabela 2. 7:</b> Teste do solvente de extracção – resultados da linearidade e RSD. ....	52
<b>Tabela 2. 8:</b> Teste do solvente de extracção – resultados da percentagem de recuperação.....	53
<b>Tabela 2. 9:</b> Valores da percentagem de recuperação e de RSD dos dois rácios em estudo.....	54
<b>Tabela 2. 10:</b> Valores da percentagem de recuperação e de RSD dos dois métodos de limpeza testados .....	55
<b>Tabela 2. 11:</b> Resultados da quantificação dos <i>musks</i> , em ng/g, nas ostras e mexilhões. ....	57
<b>Tabela 2. 12:</b> Resultados da quantificação dos <i>musks</i> , nas amostras de músculo de salmão. ....	59
<b>Tabela 2. 13:</b> Resultados da quantificação dos <i>musks</i> , nas amostras de gónadas de salmão.....	61

<b>Tabela 2. 14:</b> Resultados da quantificação <i>dos musks</i> , nas amostras de fígado de salmão.....	63
<b>Tabela 2. 15:</b> Resultados da quantificação <i>dos musks</i> , nas amostras de enguia de vidro.....	65
<b>Tabela 2. 16:</b> Resultados das análises à água do aquário (ppb) para os tempos 0, 1, 7 e 14. ....	67
<b>Tabela 2. 17:</b> Factor de bioconcentração do <i>galaxolide</i> e <i>tonalide</i> nas enguias de vidro.....	69
<b>Tabela 2. 18:</b> Cálculo do efeito de matriz (%) para as diferentes amostras analisadas. ....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Fases de transformação da amostra líquida em iões. ....	11
<b>Figura 1.2:</b> Representação esquemática do sistema de funcionamento de um ICP-MS (Adaptado de Ramón, F.R., 2014 ) .....	12
<b>Figura 1.3:</b> Mapa dos pontos de recolha das amostras (Caeiro, 2013). ....	14
<b>Figura 1.4:</b> Concentração de Cr e Pb (µg/kg) no solo, raiz e folhas de alface nas diferentes zonas de colheita. ....	31
<b>Figura 1.5:</b> Situações de alerta encontrados para as populações das duas zonas assinaladas. ....	34
<b>Figura 1.6:</b> Contribuição percentual dos vários produtos hortícolas em estudo para a dose diária de arsénio nas crianças da Carrasqueira (C110) e de Vila Nova de Milfontes (C066, C057 e C017).....	34
<b>Figura 1.7:</b> Contribuição percentual dos vários produtos hortícolas em estudo para a dose diária de arsénio no adulto de Vila Nova de Milfontes (C052).....	35
<b>Figura 2.1:</b> Esquema do GC/MS (Adaptado de Skoog et al., 2007).....	42
<b>Figura 2.2:</b> Esquema ilustrado de d-SPE (adaptado de Paolo et al., 2012). ....	45
<b>Figura 2.3:</b> Kit QuEChERS (Waters, 2014). ....	45
<b>Figura 2.4:</b> Mapa dos pontos de colheita das amostras de ostras (Monperrus, M., 2012).....	47
<b>Figura 2.5:</b> Fluxograma do método de QuEChERS. ....	48
<b>Figura 2.6:</b> Valores da percentagem de RSD e de recuperação entre os dois solventes testados para a concentração de 50 ppb. ....	53
<b>Figura 2. 7:</b> Valores de percentagem de RSD e de recuperação para os dois rácios estudados para a concentração de 50 ppb. ....	55
<b>Figura 2.8:</b> Valores de percentagem de RSD e de recuperação entre os dois métodos estudados na fase de limpeza para a concentração de 50 ppb. ....	56
<b>Figura 2. 9:</b> Concentração de <i>galaxolide</i> e <i>tonalide</i> nas amostras de ostras e mexilhões de diferentes origens. ....	57
<b>Figura 2.10:</b> Cinética de acumulação/remoção do <i>galaxolide</i> nas enguias de vidro. HHCB1 e HHCB2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados. ....	66
<b>Figura 2.11:</b> Cinética de acumulação/remoção do <i>galaxolidone</i> nas enguias de vidro. HHCB-lactona1 e HHCB-lactona 2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados. ....	66
<b>Figura 2.12:</b> Cinética de acumulação/remoção do <i>tonalide</i> nas enguias de vidro. AHTN1 e AHTN2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados. ....	67
<b>Figura 2.13:</b> Concentração de (A) <i>galaxolide</i> e (B) <i>tonalide</i> nas enguias de vidro e água do aquário ao longo do tempo de ensaio e um zoom das mesmas concentrações na água do aquário. ....	68

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**ACN** – Acetonitrilo

**ADBI** – *Celestolide*

**AFSSA** – Associação de Segurança Alimentar Asiática

**AHMI** – *Phantolide*

**AHTN** - *Tonalide*

**ATII** – *Transeolide*

**ATSDR** – Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças

**BPA** – Boas Práticas Agrícolas

**BPF** - Boas Práticas de Fabrico

**C** – Concentração

**Carrasq.**- Carrasqueira

**CV** – Coeficiente de Variação

**DPMI** – *Cashmeran*

**d-SPE** – Extracção dispersiva em fase sólida

**EDI** – Dose de Ingestão Diária

**EFSA** - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

**EN** – Norma Europeia

**EtoAC** – Acetato de etilo

**FBC** – Factor de Bioconcentração

**FC** – Frequência de Consumo

**FDA** – Administração sobre drogas e alimentos

**GC/MS** – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de massa

**HACCP** – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo

**HHCB** - *Galaxolide*

**HHCB-Lactona** – *Galaxolidone*

**IARC** - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro

**ICP-MS** – Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma indutivo

**IDT** – Dose de Ingestão Diária Tolerável

**IgD** – Ingestão diária

**ISO** – Organização Internacional de Normalização

**JECFA** – Agência de Vigilância Sanitária

**K<sub>ow</sub>** – Coeficiente de partição octanol/água

**LC<sub>50</sub>** – Dose Letal em 50% da população

**LQ** – Limite de Quantificação

**LVI** – Grande Volume de Injecção

**MA** – *Musk Ambrette*

**MDL** – Limite de Detecção do Método

**ME** – Efeito Matriz

**MK** – *Musk Ketone*

**MM** – *Musk Moskene*

**MT** – *Musk Tibetene*

**MX** – *Musk Xylene*

**N.A** – Não Aplicável

**NOEC** – Concentração na qual não se observam efeitos

**OEHHA** – Agência de Saúde Ambiental e Avaliação dos Perigos

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PBT** – Persistência, Bioacumulação e Toxicidade

**PCBs** – Pesticidas bifenilos policlorados

**PI** – Padrão Interno

**ppb** – parte por bilião

**PTV** – Vaporizador a temperatura programada

**QC** – Controlo de Qualidade

**QFA** – Questionários de frequência alimentar

**QuEChERS** – Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro

**rpm** - Rotações por minuto

**RSD** – Desvio Relativo

**Sm** – Declive da recta de calibração com adição do padrão

**SMQ** – Declive da recta de calibração procedural

**U.S.EPA** – Agência de Protecção Ambiental Americana

**UE** – União Europeia

**VNMF** - Vila Nova de Milfontes



## Introdução

A Qualidade Alimentar foi definida por Multon e Davenas em 1994 como "A aptidão de um produto para bem nutrir". Contudo, este conceito foi evoluindo e hoje é mais abrangente envolvendo igualmente as questões da segurança. Assim, pode dizer-se que a principal função de um alimento é fornecer, em condições de segurança, energia e nutrientes necessários para um bom funcionamento do organismo.

A qualidade e segurança alimentar incluem muitos fatores, tais como sabor, aroma, cor, textura, funcionalidade, saúde, custo, ambiente, trabalho decente, igualdade, tradição e cultura. A segurança alimentar é uma preocupação pública mundial. Durante as últimas décadas, a crescente preocupação pela segurança alimentar tem estimulado a pesquisa de possíveis contaminantes presentes em alimentos (Gebrekidan et al., 2013). A segurança alimentar caracteriza-se quando todas as pessoas em todos os momentos têm acesso a uma alimentação suficiente, nutritiva e isenta de riscos para a sua saúde, que lhes permita manter uma vida saudável e activa. Este conceito inclui ainda o acesso físico e económico à alimentação, que atenda às necessidades e preferências alimentares (OMS, 2014).

A segurança alimentar é suportada por três pilares fundamentais, sendo esses: A disponibilidade de alimentos, garantindo uma quantidade de alimentos suficientes e capaz de abranger toda a população mundial; O acesso aos alimentos, possibilitando recursos suficientes na obtenção de alimentos; e a utilização dos alimentos focando-se num uso adequado destes com uma boa base nutricional e cuidados higiénicos. Assim, a segurança alimentar consiste num equilíbrio entre um desenvolvimento económico e ambiental sustentável e uma vertente ligada à saúde (OMS, 2014).

A contaminação de alimentos pode ocorrer de forma accidental ou deliberada, podendo os alimentos, ser contaminados por perigos físicos, microbiológicos ou químicos. A presença destes perigos nos alimentos pode comprometer a sua segurança e a adequação (Codex Alimentarium, 2012). Os perigos químicos incluem contaminantes ambientais, metais pesados, micotoxinas, toxinas naturais, resíduos de medicamentos veterinários ou contaminantes que surgem de um processamento e/ou armazenamento inadequados (Thomson et al., 2012).

Existem muitas ferramentas, que foram tornadas obrigatórias por lei, para garantir a segurança dos produtos alimentares. Essas ferramentas incluem as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabrico (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP). As normas da Organização Internacional de Normalização (ISO) representam um importante papel na certificação de programas de garantia de qualidade e da segurança alimentar (FAO, 2014).

Os compostos químicos podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Os contaminantes orgânicos são produtos químicos à base de carbono, tais como, pesticidas,

bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, éteres de difenilo polibromados ou fragrâncias (*Musks*), entre muitos outros. A agência de protecção ambiental americana (EPA) estabeleceu limites legais para 56 contaminantes orgânicos. Os contaminantes inorgânicos são compostos químicos com uma base mineral, tais como metais e nitratos. A EPA estabeleceu 15 limites legais para contaminantes inorgânicos (EPA, 2014a).

Para reduzir o impacto negativo dos contaminantes nos géneros alimentícios e para prevenir os riscos que podem representar para a saúde humana, a União Europeia (UE) reforçou a criação de medidas para reduzir cada vez mais os teores máximos desses elementos na alimentação. Os teores máximos descritos pelos regulamentos e directivas diferem de acordo com o contaminante e com o prejuízo que estes causam à saúde do consumidor. O Regulamento (CE) Nº 315/93 estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios, proíbe a entrada no mercado de géneros alimentícios que contenham contaminantes em quantidade toxicologicamente inaceitável do ponto de vista da saúde pública. O Regulamento (CE) Nº 1831/2003 fixa os teores máximos que certos contaminantes químicos podem apresentar nos géneros alimentícios.

A melhor forma de evitar a contaminação química dos alimentos é a prevenção uma vez que, quando estes entram na cadeia alimentar mantêm praticamente inalterada a sua concentração desde a produção até ao consumidor final, sendo, em grande parte, resistentes aos tratamentos térmicos.

A crescente preocupação de segurança alimentar tem estimulado pesquisas sobre os efeitos para a saúde associados ao consumo de alimentos contaminados por perigos químicos tais como, por exemplo, pesticidas, metais pesados ou toxinas (Gebrekidan et al., 2013), bem como sobre os níveis destes contaminantes que se podem encontrar nos alimentos. Neste contexto, pretendeu-se neste trabalho avaliar o nível de contaminação de diversos grupos de alimentos com contaminantes químicos de natureza orgânica e inorgânica. Assim, no primeiro capítulo será estudada a contaminação de produtos hortícolas, bem como de amostras de água e de solo das suas zonas de produção, com metais pesados, efectuando-se uma análise de risco das populações das regiões abrangidas pela amostragem. No segundo capítulo será estudado o grau de contaminação de diversos produtos do mar com fragrâncias ou *musks*, utilizados em diversos produtos de limpeza e/ou de higiene pessoal.

## **1. Quantificação de contaminantes químicos em produtos hortícolas**

### **1.1. Introdução**

O aumento da consciencialização sobre o valor alimentar dos vegetais, como resultado da exposição a uma educação adequada, tem levado a um aumento gradual do seu consumo, particularmente entre as comunidades urbanas (Itanna, 2002).

Contudo, apesar de todos os benefícios nutricionais conhecidos, estudos têm demonstrado que o consumo de frutas e vegetais pode constituir uma importante via de exposição humana aos metais pesados (McLaughlin et al., 1999; Adamsa et al., 2004). A exposição humana a este tipo de contaminantes tem sido relacionada com um aumento da incidência de doenças crónicas, como deformações e cancro (Müller e Anke, 1994; Tembo et al., 2006; Ramadan e Al-Ashkar, 2007). Portanto, além do valor nutricional destes géneros alimentícios é de igual interesse estudar o contexto de segurança alimentar, dando relevância à acumulação de metais pesados no solo e à sua translocação para a planta.

Devido aos seus efeitos cumulativos e interações de longo prazo, a concentração de metais pesados no solo afecta negativamente a eco-segurança regional e representa uma ameaça relevante para os animais e plantas. A agricultura representa um sector de autossustentabilidade de muitas famílias, sendo que, independentemente das práticas agrícolas que executam, as pequenas explorações não são controladas o que pode levar à redução da segurança alimentar e por em risco a saúde dos consumidores. Numa escala maior, se os produtos resultantes da agricultura não tiverem um controlo adequado e rigoroso, a liberalização dos mercados pode constituir uma ameaça à segurança alimentar.

#### **1.1.1 Contaminação de Produtos Hortícolas com Metais Pesados**

Os metais pesados estão entre os principais contaminantes dos vegetais (Zaidi et al., 2005). Estes elementos não são biodegradáveis, têm meias-vidas biológicas longas, persistem por longo período de tempo nos ecossistemas, apresentando potencial para se acumularem em diferentes órgãos (Jarup, 2003; Sathawara et al., 2004; Zhang et al., 2010; Singh et al., 2010; Nabulo et al., 2011).

Oligoelementos essenciais, muitos dos elementos minerais como selénio, cobre e zinco, desempenham um papel importante na biologia humana. Estes elementos não são sintetizados no corpo e apresentam funções bioquímicas e fisiológicas importantes, sendo indispensáveis para a manutenção da saúde humana. Desta forma, a sua deficiência acarreta prejuízo na saúde. No entanto, mesmo quando indispensáveis em doses baixas, quando em doses mais elevadas, a exposição a estes elementos pode causar danos na saúde, podendo causar disfunção de órgãos humanos, sendo, alguns deles, potenciais cancerígenos. A exposição a metais pesados tem um efeito crónico, isto é o contacto com

doses relativamente baixas, que não desencadeiam de imediato reacções de toxicidade, durante um longo período de tempo pode vir a originar o aparecimento de doenças. Estudos revelam que metais pesados como o cádmio e o chumbo têm efeitos cancerígenos (Trichopoulos et al., 1997). Assim, elevadas concentrações destes metais em frutos e vegetais estão relacionadas com o aumento da prevalência de cancro gastrointestinal (Turkdogan et al., 2002).

O estudo destes elementos é importante, uma vez que uns, em certas doses são benéficos para o organismo e apresentam uma dose diária recomendada, e outros são potencialmente tóxicos, sendo indispensável a sua monitorização para garantir que os produtos se encontram em segurança de consumo e não excedem os limites máximos estipulados.

A contaminação da cadeia alimentar é um dos caminhos mais importantes para a entrada de poluentes tóxicos para o corpo humano (Ferner, 2001 ; Ma et al., 2006; Harmanescu et al., 2011). As principais vias de mobilização de metais pesados são: Solo-Cultura-Alimentação (Gebrekidan et al., 2013).

Solos contaminados por metais pesados resultantes da deposição aérea ou da irrigação com águas contaminadas são susceptíveis de induzir uma contaminação correspondente nas culturas. (Nan et al., 2002). Culturas em/ou perto de locais contaminados podem captar e acumular estes metais e exercer risco potencial quando consumidos por seres humanos e animais (Gupta & Gupta, 1998; Jarup, 2003).

A contaminação das plantas com metais pesados deve-se ao facto destas absorverem metais a partir do solo contaminado, bem como da deposição sobre as partes das plantas expostas ao ar em ambientes poluídos (Khairiah et al., 2004; Chojnacha et al., 2005; Krishna e Govil, 2007; Bigdeli e Seilsepour, 2008; Oves et al., 2012). Outros factores que contribuem para o aumento dos níveis de metais pesados nos hortícolas são a adição de lamas de depuração, fertilizantes e pesticidas, que com as alterações das propriedades físico-químicas dos solos podem ser transformados em componentes prejudiciais e absorvidos pelas culturas (Whatmuff, 2002; McBride et al., 2003). Os vegetais folhosos têm uma propensão maior para acumular metais pesados.

### **1.1.2 Efeito dos Minerais na Saúde**

#### **1.1.2.1. O Crómio**

Com uma massa atómica de 51,99, o crómio (Cr) é um metal que pode ser encontrado em diversos estados de oxidação. No estado trivalente, este metal é chamado de "elemento essencial", porque são necessárias pequenas quantidades para a manutenção da saúde humana. O Cr(III) desempenha uma papel essencial no controlo dos níveis de açúcar no sangue, desempenhando ainda funções no crescimento e na resposta imunitária. Os

alimentos que contribuem para aumentar a concentração de crómio no organismo incluem a levedura de cerveja, carnes magras, queijos, rim de porco, pães e cereais integrais e especiarias (Kohlmeier, 2003).

A forma hexavalente do crómio é aquela que se encontra associada aos principais efeitos de toxicidade mediados por este metal. O Cr(VI) é corrosivo e pode causar ulceração da pele. A exposição a elevadas doses desta forma do crómio pode causar falência renal aguda. Os compostos de crómio hexavalente são mutagénicos e o crómio neste estado de oxidação é considerado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) como cancerígeno para o Homem (Liu et al., 2008; IARC, 2014).

Na legislação portuguesa existem limites para o teor de crómio que podem surgir nas águas. Assim, a diretiva 2003/40/CE que estabelece os limites de concentração dos constituintes das águas naturais, assim como o Decreto-Lei n.º 306/2007 que estabelece os valores paramétricos para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada nas indústrias alimentares ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes, fixam o máximo de crómio 0,050 mg/L.

#### **1.1.2.2. O Níquel**

Com uma massa atómica de 58,69, o níquel (Ni) é um composto que ocorre no ambiente apenas em níveis muito baixos. Apesar de ser um oligoelemento essencial para algumas plantas, bactérias e invertebrados, nunca foram descritas síndromes associadas à carência em níquel no Homem. Alguns ensaios efectuados com compostos solúveis de níquel têm dado resultados positivos em ensaios de cancerigénese em roedores, embora outros tenham dado resultados negativos. Os maiores riscos de cancerigénese associados a este metal prendem-se com o desenvolvimento de cancro do pulmão associado à exposição ocupacional aos compostos de níquel (Liu et al., 2008). O níquel pode aparecer em alimentos como o cacau, sementes, frutos e legumes secos (Flyvholm, M.A, et al., 1984 & SCF, 2006). O limite de níquel nas águas naturais, fixado pela directiva 2003/40/CE e nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 0,020 mg/L.

#### **1.1.2.3. O Arsénio**

O arsénio (As, massa atómica de 74,92) pode apresentar-se em diferentes formas e estados de oxidação. Assim, o arsénio pode apresentar-se nas formas de ácido arsenioso (As(III)), ácido arsénico (As(V)), ácido monometilarsónico (MMAA(V)), ácido dimetilarsínico (DMAA(V)), arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC) (Demesmay et al., 1994).

A diferenciação do arsénio pelas suas diferentes formas é importante por estas apresentarem variações no grau de toxicidade, sendo as formas inorgânicas mais tóxicas do que as formas orgânicas, como a arsenobetaina e a arsenocolina, que são relativamente não tóxicas (Barra et al., 2000).

A maior fonte de arsénio na alimentação humana é o pescado, no entanto, nestes alimentos este metalóide encontra-se principalmente sob a forma orgânica. Os compostos de arsénio são convertidos pelos organismos marinhos em arsenobetaina que é uma forma praticamente inofensiva para o ser humano, porque é metilada no organismo e rapidamente excretada pela urina (Rodriguez, I.B., et al., 2009).

O arsénio não desempenha nenhuma função essencial para o Homem, não podendo ser usada nenhuma suplementação que o contenha (Kohlmeier, 2003). A ingestão de arsénio inorgânico, em doses de 70 a 180 mg, pode ser fatal. Os sintomas de intoxicação aguda incluem febre, anorexia, melanose, arritmia e, nos casos fatais, paragem cardíaca. A exposição crónica induz danos na pele, fígado, sistema nervoso, sistema vascular periférico, estando ainda associada ao aparecimento de tumores especialmente na pele, bexiga e pulmão (Liu et al., 2008), estando o arsénio e os seus compostos inorgânicos classificados pela IARC como cancerígenos para o Homem (IARC, 2014).

O limite de arsénio nas águas naturais, fixado pela directiva 2003/40/CE e nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 0,010 mg/L.

#### **1.1.2.4. O Cádmio**

O cádmio (Cd, massa atómica de 112,41) é um dos metais pesados com maior toxicidade, visto ser tóxico em níveis de exposição muito baixos, apresentando efeitos agudos e crónicos. A maior fonte de exposição ao cádmio da população não-fumadora é a alimentação. Essa contribuição vem essencialmente do consumo de produtos hortícolas, que têm grande capacidade para absorver o cádmio existente no solo (NCM, 2003).

A exposição alimentar a doses de cádmio capazes de desencadear efeitos agudos é rara. Os efeitos de exposição aguda incluem irritação severa do trato gastrointestinal. Já a exposição crónica ao cádmio tem sido associada a problemas renais, problemas a nível do esqueleto, com desenvolvimento de osteoporose e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Muitos desses efeitos resultam de distúrbios no metabolismo do cálcio. Para além de todos estes efeitos o cádmio está classificado como cancerígeno para o pulmão pela IARC (IARC, 2014) havendo também evidências que suportam uma associação entre esta exposição e o desenvolvimento de tumores na próstata, rim e pâncreas (Liu et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma dose semanal admissível provisória de 7 µg/kg de peso corporal (OMS, 1993).

O Regulamento (CE) Nº 1881/2006 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Assim, é este regulamento que fixa os máximos de cádmio que podem estar presentes nos géneros alimentícios. No caso dos produtos hortícolas esses valores variam entre os 0,05 mg/kg para todos os produtos hortícolas e frutos com excepção dos produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos, produtos hortícolas de caule, pinhões, raízes e batatas e os 0,20 mg/kg para os produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos de cultura e aipos (Regulamento (CE) Nº 1881/2006). O limite de cádmio nas águas naturais, fixado pela directiva 2003/40/CE e nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 0,003 mg/L.

#### **1.1.2.5. O Chumbo**

O chumbo (Pb, massa atómica de 207,2) é um metal pesado tóxico com um nível de exposição baixa. Este elemento tem como efeito mais crítico atraso no desenvolvimento neurológico em crianças, mesmo em baixos níveis de exposição. Outros efeitos adversos incluem complicações neurológicas, cardiovasculares, renais, gastrointestinais, hematológicas e reprodutivas (UN, 2010). O chumbo acumula-se nos ossos sendo mobilizado para a corrente sanguínea devido à reabsorção óssea. A libertação do chumbo acumulado nos ossos pode constituir uma importante fonte de exposição especialmente durante a gravidez, lactação, menopausa e nos casos de osteoporose (Liu et al., 2008; UN, 2010).

A associação entre a exposição ao chumbo e o desenvolvimento do cancro tem sido amplamente estudada, estando os compostos inorgânicos de chumbo classificados pela IARC como provavelmente cancerígenos para o Homem (IARC, 2014). A dose diária admissível de chumbo é de 3,57 µg/kg/dia (EFSA, 2010).

Segundo o Regulamento (CE) Nº 1881/2006, os limites máximo de chumbo permitidos nos produtos hortícolas variam entre os 0,1 mg/kg de peso fresco para os produtos hortícolas, com excepção de brássicas, produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos e batatas descascadas e os 0,3 mg/kg de peso fresco para as brássicas, produtos hortícolas de folha e cogumelos de cultura. O limite de chumbo nas águas naturais, fixado pela directiva 2003/40/CE e nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 0,010 mg/L.

#### **1.1.2.6. O Zinco**

O zinco (Zn, massa atómica de 65,37) é um dos mais importantes oligoelementos essenciais na nutrição humana.

A deficiência de zinco do corpo humano leva a várias doenças, mas uma ingestão excessiva de zinco também causa vários efeitos adversos agudos e crónicos (Scherz e Kirchhoff, 2006). A recomendação diária recomendada para adultos é 8 mg/ dia para mulheres e 11 mg/dia para homens (Institute of Medicine, 2002).

O zinco participa em múltiplos processos metabólicos, sendo importante para a actividade catalítica de mais de 300 metaloenzimas e constituinte de cerca de 2000 factores de transcrição (Liu et al., 2008). Segundo a EFSA, o zinco desempenha funções essenciais no crescimento e desenvolvimento do organismo durante as fases de gravidez, infância e adolescência, tendo um papel importante na maturação testicular, sendo ainda essencial para a função neurológica, cicatrização de feridas e imunocompetência (EFSA, 2006). Usualmente, os sintomas de deficiência em zinco incluem difícil cicatrização de feridas, diminuição de resistência a infecções, reduzida taxa de crescimento, perda de apetite, diarreia, alopecia, deficiências cognitivas, dermatites, alterações testiculares e comprometimento da função sexual, estando ainda esta deficiência associada ao aparecimento do cancro (EFSA, 2006; Liu et al., 2008).

Boas fontes alimentares de zinco incluem carne vermelha, trigo, passas, cereais não refinados (embora estes possam ter baixa biodisponibilidade devido ao elevado nível de fitatos) e cereais fortificados. Leite, frutas e legumes são pobres neste elemento (EFSA, 2006).

O nível máximo de ingestão tolerável para adultos é de 40 mg/dia. Um consumo superior a este valor pode induzir um esgotamento das reservas de cobre, prejudicar a função imunitária e reduzir os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (FDA, 2001; Kohlmeier, 2003), podendo ainda levar a situações de toxicidade neuronal e pancreática (Liu et al., 2008).

#### **1.1.2.7. O Manganês**

Com uma massa atómica de 54,94, o manganês é um metal de transição com valências potenciais +2, +3 e +7. Este metal funciona como um cofactor para algumas enzimas, com especial importância no metabolismo dos açúcares, metabolismo e digestão de proteínas, regeneração das cartilagens e defesa contra radicais livres (Kohlmeier, 2003).

O manganês pode ser encontrado em maiores quantidades no chá preto, nozes, grão, batata-doce e espinafres, sendo a dose diária recomendada de 1,8 mg para as mulheres e de 2,3 mg para os homens (Institute of Medicine, 2002). Doses deficientes de manganês podem estar relacionadas com o retardamento do crescimento das crianças, diminuição da fertilidade, elevada susceptibilidade para convulsões e fracturas ósseas (Kohlmeier, 2003).

A exposição crónica ao manganês é responsável por reacções tóxicas sendo o cérebro o principal órgão alvo, sendo que as interacções entre o ferro e o manganês desempenham um



papel na toxicidade do manganês (Liu et al., 2008). Teores elevados de ferro e manganês são responsáveis pela deposição de óxidos de ferro na doença de Parkinson (FDA, 2001).

O valor paramétrico para o manganês estabelecido para efeitos de controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada nas indústrias alimentares ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes é de 0,050 mg/L (Decreto-Lei n.º 306/2007).

#### **1.1.2.8. O Selénio**

O selénio é um elemento não metálico com uma massa atómica de 79, que apresenta três estados de potencial oxidação, +6, +4 e -2. As formas inorgânicas importantes são o selenato ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) e seleneto de sódio ( $\text{Na}_2\text{Se}$ ) e o cloreto de selénio ( $\text{SeCl}_2$ ).

O selénio actua na prevenção de cancro e doenças cardiovasculares e manutenção adequada do sistema imunitário (Thomson, 2013). Este elemento desempenha funções como cofactor de enzimas e proteínas com importância vital na defesa antioxidante, controla o funcionamento das hormonas da tiróide e da insulina, regula as células do crescimento e manutenção da fertilidade. A dose diária recomendada para adultos é de 55 µg/dia e para mulheres grávidas é recomendado um consumo adicional de 5 µg/dia. A carência neste elemento leva a aumento do risco de falhas cardíacas, doenças do fígado, cancro, queda de cabelo, alterações na pele e infertilidade (Kohlmeier, 2003). Os organismos aquáticos, em especial os camarões, carne, leite e produtos lácteos e os grãos constituem fontes alimentares de selénio (Liu et al., 2008).

A selenose é uma doença que se caracteriza por uma exposição crónica ao selénio e ocorre quando a exposição ao selénio supera as capacidades de excreção. Os efeitos de toxicidade manifestam-se essencialmente ao nível da pele e do sistema nervoso (Liu et al., 2008). O limite de selénio nas águas naturais, fixado pela directiva 2003/40/CE e nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 0,010 mg/L.

#### **1.1.2.9. O Cobre**

O cobre (Cu, massa atómica de 63,546) é um metal essencial encontrado em todos os organismos vivos na forma de cobre oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ou reduzido ( $\text{Cu}^+$ ) (EFSA, 2003; Tapiero et al., 2003).

Os benefícios do cobre para a saúde são diversificados, é essencial no metabolismo energético (interferindo com a respiração celular), na funcionalidade do cérebro (na

regulação de neurotransmissores), na síntese de colagénio e ainda como antioxidante sendo um escudo contra radicais livres que aumentam o risco de cancro e doenças cardiovasculares (Kohlmeier, 2003).

O consumo médio de cobre para adultos varia entre 0,6 a 1,6 mg/dia. A absorção de cobre ocorre no estômago e no intestino delgado por transporte activo, contudo a ingestão excessiva de zinco diminui a absorção de cobre (Lonnerdal et al., 1999). A percentagem de absorção de cobre pela dieta é fortemente influenciada pela quantidade de cobre ingerido, por tanto é baixa quando a ingestão de cobre é baixa e alta quando o consumo é alto (EFSA, 2006).

A deficiência de cobre caracteriza-se por desenvolvimento de anemia, neutropenia e anormalidades esqueléticas (Prentice, 1993; ATSDR, 1994; Linder e Azam, 1996; Foster e Sumar, 1997; Salgueiro et al., 2000). A exposição a doses muito elevadas de cobre está associada a danos no fígado (FDA, 2001).

O limite máximo de cobre nas águas para consumo humano fixado pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 é de 2,0 mg/L.

#### **1.1.2.10. O Cobalto**

Em quantidades pequenas o cobalto (Co, massa atómica) é um nutriente essencial, sendo um componente da vitamina B12 (cianocobalamina). Esta vitamina é essencial para a síntese dos eritrócitos, podendo a sua carência desencadear situações de anemia, perda de peso e crescimento retardado. O excesso de cobalto pode originar o aparecimento de bócio, aumento da pressão arterial, danos no sistema nervoso. Doses superiores a 10 mg/dia podem originar cardiopatias (Liu et al., 2008).

#### **1.1.2.11. O Estrôncio**

O estrôncio (Sr) é um metal semelhante ao chumbo e quimicamente muito reativo. O estrôncio apresenta quatro isótopos estáveis de ocorrência natural, o Sr-84, -86, -87, e -88 e mais doze outros isótopos são radioativos. O estrôncio-90 é o isótopo radioativo mais importante no ambiente (ATSDR, 2014).

O estrôncio-90 é utilizado como um marcador radioactivo em estudos médicos e agrícolas (EPA, 2014). O calor gerado pela desintegração do estrôncio-90 radioativo pode ser convertido em eletricidade. Todos estamos expostos a pequenas quantidades de estrôncio-90, uma vez que é amplamente disperso no ambiente e na cadeia alimentar (IAEA, 2014).

O risco de cancro aumenta com o aumento da exposição ao Sr-90 e esse risco depende da concentração de Sr-90 no ambiente e das condições de exposição.

Quantidades controladas de estrôncio-90 têm sido usadas para tratamento do cancro dos ossos e doenças dos olhos (EPA, 2014).

Após uma possível exposição ao estrôncio-90 um ensaio biológico, geralmente por exame de urina, é o teste mais comum para o diagnóstico. Tal como acontece com a maioria dos casos de contaminação interna, quanto mais cedo o teste é feito após a ingestão ou inalação do contaminante mais precisos são os resultados (EPA, 2014). Os sintomas variam segundo a intensidade e duração da exposição entre náuseas, vômitos, sintomas neurológicos e morte (Yamamoto, 2013).

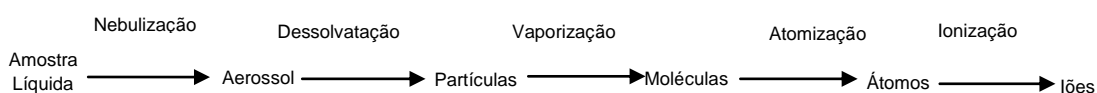
O estrôncio-90 é quimicamente semelhante ao cálcio e tende a depositar-se no tecido ósseo e medula óssea. Uma exposição ao Sr-90 pode implicar graves problemas de saúde, como: cancro dos ossos, cancro dos tecidos moles perto do osso e leucemia (Nielsen, 2004; EPA, 2014).

Estudos internacionais e em grande escala avaliam a hipótese de um fármaco (ranelato de estrôncio) combater a osteoporose. Este apresenta uma dupla acção, aumenta a formação óssea e diminui a reabsorção óssea, havendo um reequilíbrio ósseo a favor da formação óssea e aumenta a força do osso. A eficácia anti-fractura é estudada pela ingestão oral de 2 g por dia de ranelato de estrôncio (Ortolani et al., 2006).

### 1.1.3 A Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS)

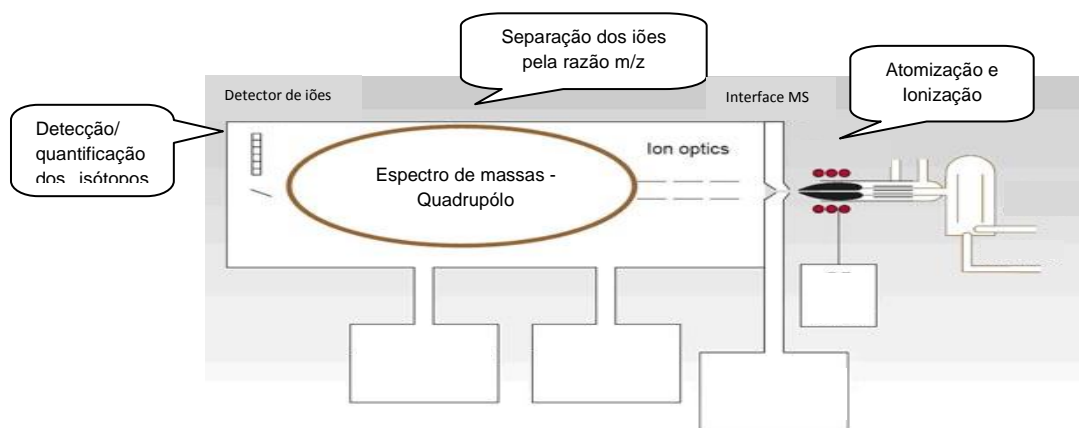
A espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS) é um método para identificar os diferentes átomos que compõe uma substância. Esta técnica permite a determinação simultânea do teor de crómio, manganês, níquel, cobre, zinco, arsénio, selénio, estrôncio, cádmio e chumbo, identificando os isótopos  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  e  $^{208}\text{Pb}$ .

Na aplicação desta técnica, a amostra líquida é introduzida no plasma onde, através de processos de transferência de energia sobre a amostra, sofre: nebulização, dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (figura 1.1). O objectivo principal desta etapa é a transformação de moléculas de grandes dimensões em iões, por acção da energia cedida, para posteriormente serem detectados e quantificados.



**Figura 1. 1:** Fases de transformação da amostra líquida em iões.

Os iões formados na etapa anteriormente descrita são, de seguida, encaminhados até ao analisador de quadrupólo onde são separados com base na sua relação massa/carga. No final do processo um detector de multiplicação de electrões quantifica os isótopos dos elementos seleccionados. Essa quantificação é possível devido à calibração do ICP-MS recorrendo a soluções padrão. A figura 1.2 apresenta de forma esquemática o funcionamento de um ICP-MS.



**Figura 1. 2:** Representação esquemática do sistema de funcionamento de um ICP-MS (Adaptado de Ramón, F.R., 2014 )

O uso de ICP-MS está a tornar-se cada vez mais comum em análise laboratorial de alimentos (Leblanc et al., 2005). A técnica tem vantagens distintas das outras vulgarmente usadas, pois inclui a capacidade de medição multielementar simultânea, limites de detecção muito baixos e permite que com a mesma injeção possam ser determinados elementos maiores e elementos traço devido a uma gama dinâmica linear (Ammann, 2007; Parsons e Barbosa, 2007).

No entanto, e como todas as técnicas laboratoriais, esta técnica tem igualmente limitações. Na análise de amostras com uma concentração elevada de matéria orgânica, como é o caso das amostras alimentares, há a possibilidade de ocorrência de interferências da matriz e/ou interferências no espectro de iões poliatómicos. Estes efeitos podem ser eliminados ou minimizados pelo uso de isótopos alternativos e/ou equações de correcção de interferências. A digestão da amostra vai também controlar as interferências e tem o objectivo de reduzir a quantidade de carbono presente (Nardi, 2009).

#### 1.1.4 Enquadramento e Objectivo do Primeiro Capítulo

Conforme anteriormente referido, a contaminação dos produtos hortícolas com metais pesados, que acontece devido à contaminação dos solos e da atmosfera, representa uma ameaça para a segurança e qualidade destes produtos. A toxicidade potencial, natureza persistente e comportamento acumulativo dos metais pesados, bem como o consumo cada vez maior de hortícolas, conduz à necessidade de testar e analisar os alimentos para assegurar que os níveis destes contaminantes estão de acordo com os requisitos

internacionais acordados e por isso não trazem riscos à saúde do consumidor. É, desta forma, de importância relevante que ocorram levantamentos regulares e programas de monitorização das concentrações de metais pesados em produtos alimentares. Neste contexto o primeiro capítulo desta tese teve como objectivo principal determinar o grau de contaminação de produtos hortícolas provenientes de duas zonas, a zona da Carrasqueira, situada junto ao estuário do rio Sado, perto de uma zona industrial e rotulada como zona de contaminação, e uma zona de controlo ou de referência que foi a zona de Vila Nova de Milfontes, situada perto de um estuário “considerado limpo”, o Estuário do rio Mira.

A escolha da zona da Carrasqueira teve como base estudos realizados anteriormente que determinaram elevado grau de contaminação em peixes, moluscos e crustáceos no rio Sado, pelo que desencadeou o interesse de verificar o grau de contaminação de culturas que tivessem acesso à água do rio através da rega.

Para cumprir o objectivo proposto foi necessário descodificar, com a realização de questionários de frequência alimentar (QFA) feitos a habitantes dessas zonas, quais os produtos hortícolas mais consumidos e quais as quantidades consumidas. Estes questionários permitiram seleccionar os alimentos mais indicados ao estudo. Com as respostas adquiridas, constatou-se que os alimentos pertencentes ao subgrupo dos hortícolas consumidos em maior quantidade e mais vezes nas refeições eram a couve, a alface, a batata, o tomate e a cebola.

A primeira fase deste ponto do trabalho teve por objectivo analisar contaminantes – metais pesados e metalóides – nos produtos hortícolas seleccionados, bem como na água de rega e no solo, por espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS). Os contaminantes determinados e quantificados ICP-MS para os géneros alimentícios seleccionados foram o crómio, níquel, arsénio, cádmio, chumbo, zinco, manganês, selénio e estrôncio. Nas amostras de água os elementos determinados e quantificados foram o crómio, níquel, arsénio, cádmio, chumbo, cobalto e selénio. Para as amostras de solo foram determinados o crómio, níquel, cobre, arsénio, cádmio, chumbo, zinco, manganês, selénio e estrôncio.

Este capítulo teve ainda como objectivo avaliar o risco de exposição dos habitantes daquelas zonas a metais pesados provenientes dos hortícolas comparando a Dose de Ingestão Diária (EDI) com a Dose de Ingestão Diária Tolerável (IDT) recorrendo ao TDS 2 (Second French Total Diet Study),

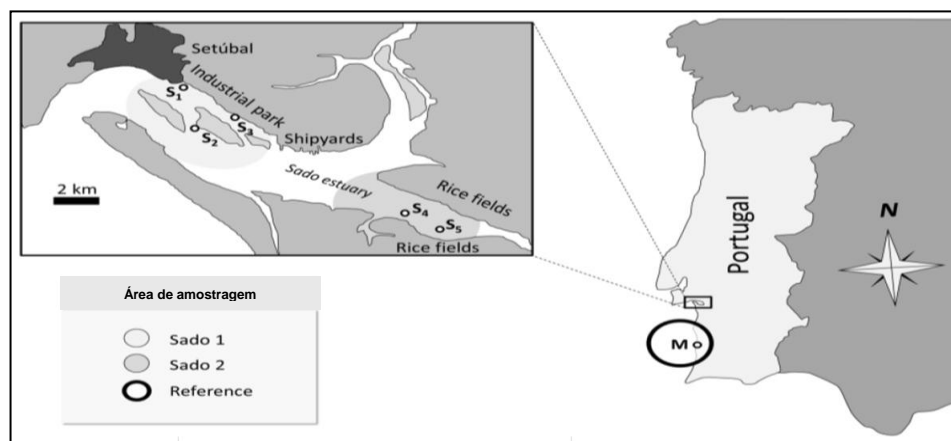
## 1.2. Materiais e Métodos

### 1.2.1. Plano de Amostragem

Este trabalho incidiu no estuário do Sado, que se localiza na costa oeste de Portugal. Esta área está parcialmente classificada como reserva natural, mas é ameaçada por muitas fontes de pressão antrópica e escoamento de terras agrícolas, dando origem a um estuário moderadamente contaminado em algumas áreas.

A pequena comunidade da vila da Carrasqueira (Carrasq.) está localizada na margem sul do Estuário do Sado, onde estudos epidemiológicos anteriores confirmaram várias vias de exposição a contaminantes nomeadamente pelo consumo de água e alimentos. Outra população, Vila Nova de Milfontes (VNMF), estabelecida perto de um estuário “considerado limpo”, o Estuário do rio Mira, foi analisada como referência.

Nas duas zonas em estudo foram recolhidas amostras de tomate, alface, couve, batata e cebola e ainda de água e solo que estivesse em contacto directo com estas culturas. As amostras dos vegetais, bem como o solo e a água foram colhidos de três quintas em cada população (VNMF e Carrasq.). Assim, na zona da Carrasqueira foram colhidas amostras das quintas designadas por Carrasq. 1 (zona S1 da figura 1.3), Carrasq. 2 (zona S2 da figura 1.3) e Carrasq. 3 (zona S4 da figura 1.3). Na zona de referência VNMF (Mo na figura 1.3) foram escolhidas igualmente 3 zonas representativas (VNMF 1, VNMF 2 e VNMF 3).



**Figura 1. 3:** Mapa dos pontos de recolha das amostras (Caeiro, 2013).

Em cada zona foram colhidos três amostras de cada um dos produtos hortícolas seleccionados. As amostras de hortícolas, num total de 26, foram identificadas de acordo com a codificação apresentada na tabela 1.1.

**Tabela 1. 1:** Codificação das amostras de hortícolas

Zona	Hortícola	Identificação da Amostra	Nº de amostras	Zona	Hortícola	Identificação da Amostra	Nº de amostras
Vila Nova de Milfontes	Couve	VNMF 1 VNMF 2 VNMF 3	3	Carrasqueira	Couve	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3
	Alface	VNMF 1 VNMF 2	2*		Alface	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3
	Batata	VNMF 1 VNMF 2 VNMF 3	3		Batata	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3
	Tomate	VNMF 1 VNMF 2 VNMF 3	3		Tomate	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3
	Cebola	N.A	N.A		Cebola	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3

\*Perda de amostra devido à elevada perecibilidade do produto; N.A – Não houve colheita deste hortícola na zona indicada

Para estudo das possíveis fontes de contaminação, foram igualmente recolhidas amostras de solo e água. As amostras de solo provieram dos mesmos terrenos das culturas seleccionadas (solo em contacto com os produtos recolhidos) e as amostras da água usada para rega foram recolhidas de poços. As amostras de água e solo foram identificadas de acordo com a codificação apresentada na tabela 1.2.

**Tabela 1. 2:** Codificação das amostras de água e solo

Zona	Amostra	Identificação da Amostra	Nº de amostras	Zona	Amostra	Identificação da Amostra	Nº de amostras
Vila Nova de Milfontes	Água	VNMF 1 VNMF 2 VNMF 3	3	Carrasqueira	Água	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3
	Solo	VNMF 1 VNMF 2 VNMF 3	3		Solo	Carrasq.1 Carrasq.2 Carrasq.3	3

No final das colheitas obteve-se um total de amostras a analisar de n=38, representativas de hortícolas, água e solo das duas zonas assinaladas.

### 1.2.2. Análise dos Metais e Metalóides por ICP-MS

O grau de contaminação destas amostras foi determinado de acordo com a quantificação simultânea do teor de elementos vestigiais, estando os elementos predefinidos no ICP-MS.

#### 1.2.2.1. Preparação das Amostras

A preparação das amostras foi efectuada feita de acordo com a norma EN 13804. Apenas a parte edível dos produtos hortícolas foi analisada. Na preparação de amostras foi necessário aplicar procedimentos e cuidados especiais, como sejam o impedir o contanto da amostra com objectos metálicos. Assim, na fase de trituração da amostra recorrendo ao Grindomix foram utilizadas apenas lâminas de titânio e toda a água utilizada para lavagem das amostras e lâminas foi água ultrapura (MILIQ).

Numa primeira fase as amostras sofreram uma liofilização (HETO, POWERDRY 9000), de forma a remover toda a água. Esta etapa teve a duração de 48 horas. Em seguida as amostras foram trituradas, com o auxílio do GRINDOMIX, com o objectivo de homogeneizar as amostras e aumentar a exactidão entre os duplicados.

Depois de liofilizadas e homogeneizadas as amostras foram digeridas de forma a destruir toda a matéria orgânica reduzindo, assim, as interferências na análise. A duração deste processo foi de aproximadamente 40 minutos incluindo o arrefecimento dos vasos. A digestão foi efectuada em sistema de microndas (ETHOS 1, Milestone) em vasos fechados segundo a EN 13805. Nesta técnica, o risco de contaminação e as perdas por volatilização de analitos da amostra são praticamente nulas (DeLafuente e Juarez, 1995 ; Lima et al., 2000). A programação do microndas de acordo com a matriz a estudar encontra-se na tabela 1.3.

**Tabela 1. 3:** Programa de digestão por microndas usado para a matriz hortícolas

Programa 1	Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
	1	10	850	180
	2	5	0	180
	3	6	1100	210
	4	5	0	210
	5	6	650	90

Pesaram-se aproximadamente 0,6 g de amostra para 10 dos 12 vasos do rotor do microndas, havendo um duplicado de cada amostra. No vaso 11, foi colocado o material de referência certificado para a matriz em estudo, sendo que o peso do material de referência foi de aproximadamente 0,5 g.



O material de referência usado foi o GBW 10014 indicado para amostras biológicas e 1548a indicado para dieta típica. A utilização destes materiais permite a validação dos resultados. O material de referência escolhido passou pelas mesmas etapas e condições das amostras (adição de reagentes, digestão e leitura) sendo assim possível verificar a existência de contaminações ou erros através da comparação dos valores obtidos com os valores do certificado.

A cada vaso adicionou-se 4 mL de  $\text{HNO}_3$ , 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas quantidades são adequadas devido à presença de uma sonda que controla toda a digestão e que tem de estar emersa nos reagentes. Em cada rotor foi sempre colocado pelo menos um branco, e um controlo de qualidade (material de referência). Os brancos vão garantir que não houve contaminações no processo, devendo os valores dos brancos estar abaixo do primeiro ponto da curva de calibração definida.

Após a digestão estar concluída, recolheu-se toda a solução para balões de perfluoroalcóxido (PFA) e perpez-se com água ultrapura. A concentração de ácido na amostra foi controlada uma vez que o aparelho não aceita concentrações elevadas de ácido que levam a erros de leitura e danos físicos nas tubagens.

#### **1.2.2.2. Leitura das Amostras no ICP-MS**

Começou por se efectuar uma leitura prévia das amostras no ICP-MS para se adequar a diluição a fazer a determinados elementos que apresentavam concentrações muito elevadas nas amostras. O objectivo das diluições é o de adequar a concentração dos elementos maiores para incidirem na curva de calibração desenhada, uma vez que só são garantidos os resultados que se encontram dentro da curva de calibração.

Para a construção das curvas de calibração preparam-se sete soluções padrão com concentrações conhecidas. Para a construção da curva de calibração foram escolhidas concentrações tendo sempre em conta a gama de trabalho para os elementos a determinar (tabela 1.4). A partir do padrão – MERCK XVI multielementar, com uma concentração de 100.000 ppb, preparou-se um solução-mãe de 500 ppb para um volume final de 50 mL. A solução-mãe foi assim preparada juntando 250  $\mu\text{L}$  de padrão multielementar em balão PFA de 50 mL e água acidificada com  $\text{HNO}_3$  a 2% para perfazer o volume final.

**Tabela 1. 4:** Gama de trabalho na determinação de metais e metalóides no ICP-MS.

<b>Elemento</b>	<b>Gama de Trabalho (µg/L)</b>
Manganês	0,25-30
Arsénio, cádmio, cobalto, cobre	0,25-50
Chumbo, estrôncio, níquel	0,50-30
Crómio, selénio	0,50-50
Zinco	2,5-50

Na realização desta análise foram utilizados pontos de controlo de qualidade (QC's). Estes QC's garantem a aceitação da curva de calibração, porque são adicionadas concentrações conhecidas que têm que coincidir com a curva, sendo esses pontos feitos exactamente como os pontos para a curva, mas utilizando outro lote do mesmo padrão ou de um padrão diferente. Ao coincidirem com a recta já definida garantem boas leituras do aparelho. Foram apenas escolhidos dois pontos de controlo: QC1 0,5 µg/L e QC2 10 µg/L. Conforme anteriormente referido, nesta análise foram também utilizados materiais de referência para garantir a veracidade dos resultados. Na tabela 1.5 e estão representados alguns dos critérios de controlo de qualidade dos resultados, como o coeficiente de variação que não deve ser superior a 10%, o valor certificado do material de referência, bem como o valor encontrado após a análise.

As condições operacionais do ICP-MS encontram-se na tabela 1.6. Só foram aceites valores para os replicados cujo coeficiente de variação (%CV) não fosse superior a 10%. As curvas de calibração foram aceites sempre que o coeficiente de distribuição linear fosse maior ou igual a 0,9995.

Tabela 1. 5: Parâmetros de controlo de qualidade.

Elemento	Limite de Quantificação (LQ) (µg/Kg)	Coefficiente de Variação (%)	Material de Referência	Valor certificado (µg/Kg)	Valor do material de referência encontrado (µg/Kg)
Crómio	i) 6	0-9.96	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 1800±300 b) N.A	a) 2063 b) N.A
	ii) 2	0-9.84			
	iii) 4	0-8.34			
	iv) 3	0-7.30			
	v) 4	0-9.90			
Níquel	i) 6	0-5.18	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 930±100 b) 369±23	a) 949 b) 384
	ii) 2	0-3.75			
	iii) 4	0-8.91			
	iv) 3	0-7.98			
	v) 4	0-6.21			
Arsénio	i) 3	0-9.83	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 62±14 b) 200±10	a) 69 b) 199
	ii) 1	0-6.19			
	iii) 2	0-7.38			
	iv) 1	0-1.98			
	v) 2	0-8.72			
Cádmio	i) 3	0-3.27	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 35±6 b) 35±2	a) 31 b) 34
	ii) 1	0-9.14			
	iii) 2	0-6.27			
	iv) 1	0-1.28			
	v) 2	0-1.95			
Chumbo	i) 6	0-7.10	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 190±30 b) 44±9	a) 162 b) 52
	ii) 2	0-4.40			
	iii) 4	0-5.67			
	iv) 3	0-6.35			
	v) 4	0-7.09			
Zinco	) 600	0-5.75	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 26000±2000 b) 24600±1790	a) 25380 b) 23212
	i) 576	0-4.72			
	ii) 388	0-2.38			
	v) 252	0-1.68			
	v) 880	0-4.83			
Manganês	i) 60	0-1.50	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 18700±800 b) 5750±170	a) 18895 b) 5816
	ii) 58	0-0.82			
	iii) 39	0-3.61			
	iv) 25	0-0.87			
	v) 44	0-1.97			
Selénio	i) 6	0-6.49	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 200±30 b) 245±28	a) 215 b) 271
	ii) 2	0-8.83			
	iii) 4	0-8.91			
	iv) 3	0-8.70			
	v) 4	0-8.40			
Estrôncio	i) 60	0-1.57	a) GBW 10014 b) 1548a	a) 48000±3000 b) 2930±100	a) 48162 b) 2813
	ii) 58	0-1.15			
	iii) 39	0-1.30			
	iv) 25	0-4.37			
	v) 88	0-1.44			

NA = Não aplicável; i) Couve ii) Alface iii) Batata iv) Tomate v) Cebola; a) GBW 10014 – “Biological Sample. Institute of Geophysical and Geochemical Exploration”; b) SRM 1548a - “Typical Diet. National Institutes of Standards and Technology”

**Tabela 1. 6:** Condições operacionais do ICP-MS.

ICP-MS	
Thermo X series II	
Extracção	-113,7
Foco	10,0
Polarização	-0,1
Polarização do Hexapolo	-3,0
Taxa de Nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	0,87
Potência (W)	1404
Taxa de fluxo de gás (L min <sup>-1</sup> )	13,0
Caudal do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,90
Profundidade de Amostragem	120
Resolução Padrão	135
Alta Resolução	150
Detector Analógico	1902
Detector PC	3353

### 1.2.3. Questionários ao Consumo

Para seleccionar os produtos hortícolas a ser analisados e para avaliar o respectivo consumo, de modo a poder efectuar, posteriormente, uma análise de risco de exposição a metais pesados através do consumo de hortícolas, foi necessário começar por efectuar um questionário de frequência alimentar (QFA) à população assinalada como de risco, a população da Carrasqueira, e à população da zona de controlo, a população de Vila Nova de Milfontes.

A este inquérito responderam 102 residentes na Carrasqueira e 100 residentes em Vila Nova de Milfontes de diferentes idades (crianças, adultos e idosos) e género. O QFA tinha presente 50 sugestões incluindo alimentos e bebidas.

Para cada item do QFA, os participantes respondiam sobre o consumo médio nos últimos 12 meses. Este período alargado de tempo tem a vantagem de englobar todas as datas festivas, bem como as estações do ano que fazem variar o consumo alimentar, mas, por outro lado, tem a desvantagem de poder levar a erros de memória.

Tendo em conta o consumo individual, a pessoa poderia assinalar entre sete respostas possíveis de consumo: Nunca ou menor que uma vez por mês, uma a três vezes por mês, uma vez por semana, duas a quatro vezes por semana, cinco a seis vezes por semana, uma vez por dia e duas a três vezes por dia.

A recolha de informação foi feita com deslocação de técnicos de saúde, previamente treinados, à residência dos participantes. As entrevistas decorreram entre Junho e Julho de 2012.

Os resultados do QFA revelaram como produtos mais consumidos e posteriormente recolhidos para estudo a batata, couve, alface e tomate.

#### **1.2.4. Pressupostos para Tomada de Decisão na Análise de Risco**

1º Pressuposto: Os inquéritos apenas apresentavam frequências de consumo, por isso, foi necessário definir factores que correspondessem a essas frequências que variam do mínimo de nunca para um máximo de uma a três vezes por dia. Os factores aplicados foram então de zero para a frequência “Nunca a menor que três vezes por mês”; 0,06 para “uma a três vezes por mês”; 0,133 para “uma vez por semana”; 0,4 para “duas a quatro vezes por semana”; 0,733 para “cinco a seis vezes por semana”; 1 para “uma vez por dia”; e um factor de 2,5 para a frequência de “duas a três vezes por dia”.

2º Pressuposto: Foram definidos dois cenários possíveis; O primeiro, designado de cenário intermédio, em que o consumo foi multiplicado pela concentração média encontrada para aquele elemento naquele legume; O segundo, designado de pior cenário, em que o consumo foi multiplicado pela concentração máxima do metal para o devido alimento.

3º Pressuposto: Para crianças nascidas antes de 2009 foi definido o consumo de porções mínimas com o erro associado porque há crianças que se alimentam muito bem e uma dose mínima é insuficiente. Para os adultos foi assumida uma dose média, igualmente com erros associados, uma vez que pelo peso encontrado em alguns adultos possivelmente o consumo seria de uma dose grande.

4º Pressuposto: Numa primeira fase foi calculada a concentração de metal pesado real por cada alimento consumido e numa segunda fase foi a concentração total do metal pesado pelo consumo de todos os vegetais por dia, uma vez que, numa refeição é possível o consumo de batata, couve, alface e tomate, e assim ter uma concentração acumulada por dia.

O cálculo da ingestão diária (IgD) de cada metal foi obtido pela seguinte equação (Zheng et al., 2007):

$$\text{IgD } (\mu\text{g /dia}) = C \times Fc$$

Em que C é a concentração do elemento encontrada em cada produto (Alface, Couve, Batata e Tomate) e FC é a frequência de consumo de cada um desses produtos. A divisão da IgD pelo peso real de cada indivíduo permitiu, posteriormente, calcular a dose diária estimada (EDI) em  $\mu\text{g/kg/dia}$ .

### 1.3. Resultados e Discussão

#### 1.3.1. Resultados obtidos nas amostras de produtos hortícolas

Os resultados (média  $\pm$  desvio padrão) dos vários elementos nas várias amostras de produtos hortícolas analisadas encontram-se na tabela 1.7.

Analisando a contaminação em cádmio pode verificar-se que a alface proveniente da Carrasqueira 2 apresenta um valor bastante elevado comparando com outras alfaces e também comparando com as restantes amostras. No caso do níquel e do arsénio os valores são mais elevados nas amostras de couve comparando com as restantes amostras. O cádmio tem o valor mais elevado para a amostra de batata proveniente de Vila Nova de Milfontes 3. O chumbo aparece apenas nas amostras de couve, alface e batata, apresentando o valor mais elevado na amostra de couve proveniente da Carrasqueira 2. O zinco, o manganês e o estrôncio são os elementos maioritários, aparecendo em maiores concentrações nas várias matrizes analisadas. Em relação ao selénio foi novamente a couve o produto que apresentou maior concentração deste mineral. Pelo contrário, a sua concentração nas amostras de cebola ficou sempre abaixo do limite de quantificação.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura consultada. Com efeito, segundo a literatura, os legumes de folhas geralmente crescem mais rapidamente com taxas de transpiração mais elevadas do que tubérculos (Luo et al., 2011), sendo a absorção de metais pelas raízes das plantas maior em vegetais de folhas, como a couve e a alface (Stalikas et al., 1997; Zheng et al., 2007), por outro lado, devido à grande área foliar, os vegetais de folha são mais susceptíveis à acumulação de metais através de poeiras do solo e da água da chuva (Kucharski et al., 1994; Luo et al., 2011).

A legislação existente apenas apresenta limites máximos para o cádmio e o chumbo, sendo esses valores variáveis dependendo do produto hortícola. Assim, para as matrizes analisadas o limite máximo de chumbo é de 300  $\mu\text{g/kg}$  peso fresco para a couve e alface e de 100  $\mu\text{g/kg}$  peso fresco para a batata, tomate e cebola. Já o cádmio tem como valores máximos, 200  $\mu\text{g/kg}$  peso fresco para couve e alface, 100  $\mu\text{g/kg}$  peso fresco para batata e cebola e 50  $\mu\text{g/kg}$  peso fresco para tomate (Regulamento (CE) nº 1881/2006). Comparando os valores legislados com os obtidos é possível concluir que todas as amostras apresentam valores de cádmio e chumbo abaixo dos máximos permitidos por lei.

**Tabela 1. 7:** Dados Analíticos - elemento por amostra.

Amostra	Zona	Elementos (µg/kg peso fresco) Média± desvio padrão								
		Cr	Ni	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se	Sr
Couve	VNMF 1	-	64±3,3	31±1,0	4±0,1	<LQ	3345±73,1	2638±0,4	61±2,8	4716 ±18,5
	VNMF 2	-	49±2,5	12±1,1	5±0,0	<LQ	3133±26,9	1539±7,9	13±0,8	3709±9,2
	VNMF 3	28±0,0	44±1,2	24±0,1	10±0,2	7±0,2	3231±27,5	3743±8,3	23±0,8	4482±3,3
	Carrasq.1	-	-	19±1,8	4±0,0	4±0,3	2749±11,1	2304±34,7	47±0,9	8791±138
	Carrasq.2	37±3,7	57±0,5	114±4,9	8±0,0	17±0,4	3114±179	4179±0,6	39±2,6	11261±23,9
	Carrasq.3	22±0,2	21±1,6	-	2±0,0	5±0,1	2489±13,4	1653±8,0	-	3020±10,2
Alface	VNMF 1	9±0,9	14±0,5	3±0,2	3±0,2	7±0,3	2638±25,3	535±3,7	5±0,8	833±6,9
	VNMF 2	-	17±0,5	2±0,1	5±0,1	<LQ	3017±22,1	1833±4,6	3±0,3	559±2,5
	VNMF 3	23±0,3	16±0,6	4±0,1	9±0,1	4±0,1	4001±29,2	5526±18,9	7±0,5	1230±1,8
	Carrasq.1	20±1,8	12±0,3	4±0,8	2±0,2	3±0,9	2872±103	986±7,2	9±30,3	1178±5,7
	Carrasq.2	246±1,6	26±0,4	15±0,6	8±0,1	3±0,0	4604±176	12081±49,0	<LQ	870±8,8
Batata	VNMF 1	23±0,0	11±1,1	14±0,1	13±0,0	<LQ	3417±2,94	689±13,2	20±0,1	97±0,0
	VNMF 2	10±0,7	12±0,3	4±0,3	6±0,0	<LQ	2980±94,3	1081±4,1	5±0,1	98±0,3
	VNMF 3	25±0,9	27±0,0	<LQ	20±0,0	<LQ	4446±99,1	1663±5,2	<LQ	106±0,1
	Carrasq.1	12±0,8	9±0,8	4±0,3	3±0,0	<LQ	3020±34,9	746±1,8	15±1,5	156±0,1
	Carrasq.2	12±0,0	28±0,1	41±0,1	6±0,0	9±0,1	2558±0,01	707±0,4	12±0,1	43±0,0
	Carrasq.3	11±0,2	7±0,5	10±0,6	4±0,1	<LQ	3107±19,6	1113±0,6	29±1,0	36±1,1
Tomate	VNMF 1	-	-	6±0,9	3±0,0	<LQ	2047±34,5	790±6,9	7±0,6	241±2,8
	VNMF 2	5±0,3	6±0,3	4±0,4	2±0,1	<LQ	1534±18,8	1194±9,4	3±0,3	87±4,6
	VNMF 3	6±0,5	4±0,2	3±0,1	2±0,0	<LQ	1511±227	776±2,9	10±0,4	132±0,4
	Carrasq.1	-	5±0,3	2±1,7	2±0,0	<LQ	1745±3,73	494±0,8	4±0,1	154±69,5
	Carrasq.2	13±0,2	15±0,0	6±0,3	3±0,1	<LQ	1483±7,38	1226±2,9	3±0,1	97±29,2
	Carrasq.3	21±0,2	11±0,4	3±0,0	4±0,1	<LQ	2802±2,21	1089±5,1	5±0,4	53±0,6
Cebola	Carrasq.1	2±0,0	4±0,0	2±0,0	1±0,0	<LQ	3885±317	1378±15,1	<LQ	17261±13,3
	Carrasq.2	2±0,0	4±0,0	1±0,0	1±0,0	<LQ	1437±44,4	969±14,6	<LQ	6834±10,3
	Carrasq.3	2±0,0	5±0,0	1±0,0	2±0,0	<LQ	4397±234	1670±3,8	<LQ	20647±22,9



A análise dos resultados não revela uma contaminação muito superior nos vegetais produzidos na zona da Carrasqueira em relação aos produzidos na zona controlo de Vila Nova de Milfontes. No entanto, é possível destacar a quinta Carrasqueira 2 como sendo o local de maior contaminação com arsénio, realidade especialmente verificada no caso da couve, e a zona de VNMF 3 como a que apresenta maior contaminação com cádmio, sendo esta diferença mais notória no caso da batata. A zona Carrasqueira 2 também se destaca na contaminação com crómio nos vegetais de folha, em especial na alface, contudo essa diferença não é acompanhada nas restantes matrizes analisadas.

### 1.3.2. Resultados obtidos nas amostras de água de rega

A tabela 1.8 apresenta os resultados da determinação da concentração de metais na água que servia para regar as culturas. Esta determinação foi efectuada para verificar se a água de rega poderia constituir uma possível fonte de contaminação. Na tabela 1.8 apresenta-se ainda o limite de quantificação de cada um dos elementos analisados bem como o máximo recomendado e admissível permitido por lei para as águas de rega, de acordo com o Decreto-Lei nº 236/98.

**Tabela 1. 8:** Dados analíticos da água de rega

Água	Elementos (µg/L) Media ± desvio padrão						
	Cr	Ni	As	Cd	Pb	Co	Se
VNMF 1	1,09±0,08	6,82±0,01	0,80±0,05	0,26±0,001	4,13±0,04	0,64±0,00	2,60±0,09
VNMF 2	0,73±0,05	1,61±0,05	0,77±0,02	<LQ	1,00±0,03	0,40±0,01	1,30±0,05
VNMF 3	0,77±0,04	1,69±0,01	0,63±0,01	<LQ	<LQ	0,50±0,004	1,60±0,19
Carrasq.1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,30±0,06	<LQ	<LQ
Carrasq.2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Carrasq.3	0,56±0,01	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,53±0,01
LQ	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5
Valor Máximo Recomendado	100	500	100	10	5 000	50	20
Valor Máximo Admissível	20 000	2 000	10 000	50	20 000	10 000	50

Analisando os resultados obtidos é possível concluir que todas as águas se encontram dentro dos limites legais de águas destinadas à rega, estabelecidos pelo Decreto-Lei n.º 236/98.

No que diz respeito aos elementos analisados é possível verificar que as águas cumprem até os requisitos estabelecidos pela directiva 2003/40/CE, que estabelece os limites máximos de concentração para os constituintes das águas minerais naturais bem como os máximos fixados pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 para as águas de consumo humano, que estabelece os limites máximos para o Cr, Ni, As, Cd, Pb e Se em 50, 20, 10, 5, 10 e 10 µg/L, respectivamente.

Comparando as duas zonas em análise é possível verificar que a água de rega de Vila Nova de Milfontes apresenta níveis mais elevados de contaminação, com os elementos em estudo, do que as águas de rega da zona da Carrasqueira. Dentro das três zonas estudadas em Vila Nova de Milfontes é a VNMF1 a que apresenta maior nível de contaminação. Contudo, a contaminação das águas de rega não parece constituir uma fonte de contaminação com os elementos em estudo devido, não só, aos baixos níveis de metais que estas apresentam, mas também, ao facto da tendência de contaminação das águas não acompanhar a tendência verificada na contaminação dos produtos hortícolas.

### **1.3.3. Resultados obtidos nas amostras de solo**

A contaminação por metais no solo recebe cada vez mais atenção em todo o mundo, devido ao aumento da exposição humana à contaminação do solo, através do triângulo: solo-planta-consumo humano. A transferência solo-planta é um dos componentes chave da exposição humana aos metais através da alimentação (Jolly, 2013). Estudos revelam que os vegetais podem ser contaminados com metais pesados se crescerem em solos contaminados (Cui et al., 2004), sendo os níveis de contaminação em vegetais e nos solos de grande interesse público devido ao risco que podem acarretar para as populações (Xie et al., 2006; Wang et al., 2008).

Os resultados das análises efectuadas ao solo que serve de suporte aos produtos hortícolas analisados encontram-se na tabela 1.9. Na mesma tabela são igualmente indicados os limites de quantificação e os limites máximos (µg/kg) para cada elemento de acordo com o Canadian Soil Quality Guidelines.

Comparando os resultados obtidos com a referência (Canadian Soil Quality Guidelines), é possível constatar que todos os valores estão abaixo do limite máximo. O solo proveniente de VNMF1 é o que apresenta teores mais elevados de todos os elementos analisados com excepção do chumbo (Carrasq. 3), selénio (VNMF2) e estrôncio (Carrasq. 1). Desta forma, é possível verificar alguma concordância entre as amostras de água e de solo. Contudo, tal como verificado com a contaminação das águas, também a tendência de contaminação dos solos não acompanha a tendência verificada na contaminação dos produtos hortícolas.

**Tabela 1. 9:** Dados analíticos do solo em contacto com as culturas.

Solo	Elementos ( $\mu\text{g/kg}$ ) Média $\pm$ Desvio padrão									
	Cr	Ni	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se	Sr
VNMF 1	6587 $\pm$ 0,85	2759 $\pm$ 0,07	4937 $\pm$ 0,12	2304 $\pm$ 0,19	<LQ	6474 $\pm$ 0,92	30772 $\pm$ 1,87	88460 $\pm$ 2,86	<LQ	12125 $\pm$ 0,11
VNMF 2	2144 $\pm$ 0,16	<LQ	1917 $\pm$ 0,02	<LQ	<LQ	2117 $\pm$ 0,03	<LQ	68414 $\pm$ 0,14	1208 $\pm$ 0,04	5775 $\pm$ 0,07
VNMF 3	2249 $\pm$ 0,21	<LQ	2044 $\pm$ 0,19	725 $\pm$ 0,07	<LQ	2682 $\pm$ 0,02	<LQ	34501 $\pm$ 1,35	1036 $\pm$ 0,04	5523 $\pm$ 0,62
Carrasq.1	4270 $\pm$ 0,08	1115 $\pm$ 0,11	4526 $\pm$ 0,16	546 $\pm$ 0,13	<LQ	4577 $\pm$ 0,31	<LQ	46441 $\pm$ 0,01	<LQ	15419 $\pm$ 1,19
Carrasq.2	3628 $\pm$ 0,08	1186 $\pm$ 0,11	5590 $\pm$ 0,35	1092 $\pm$ 0,17	<LQ	10172 $\pm$ 0,44	<LQ	24558 $\pm$ 0,01	<LQ	3384 $\pm$ 0,12
Carrasq.3	3434 $\pm$ 0,30	1514 $\pm$ 0,06	4050 $\pm$ 0,23	1331 $\pm$ 0,33	<LQ	24052 $\pm$ 0,48	<LQ	41298 $\pm$ 0,07	<LQ	6144 $\pm$ 0,58
LQ	2000	1000	1000	500	500	1000	20000	1000	1000	2000
Limite Máximo*	64000	50000	63000	12000	1400	70000	200000	n.a	10000	n.a

\*Canadian Soil Quality Guidelines ( $\mu\text{g/kg}$ ); n.a. Não aplicável.

Os solos podem ser contaminados pela acumulação de metais pesados e metalóides através da proximidade com áreas industriais em rápida expansão, contacto com gasolina com chumbo e tintas, aplicação de fertilizantes, derrame de esgotos, pesticidas, irrigação de águas residuais, resíduos de combustão de carvão, derramamento de produtos petroquímicos e deposição por parte da atmosfera (Khan, 2008; Zhang, 2010). O maior problema relacionado com a presença de metais no solo resulta da maioria deles não sofrer degradação microbiana nem química (Kirpichtchikova et al., 2006), pelo que a sua concentração total persiste durante um longo período de tempo após a sua introdução (Adriano, 2003) mantendo-se, assim, disponíveis para serem absorvidos pelas culturas.

Alguns solos são deficientes em metais, como o Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn, que são essenciais para o crescimento saudável das plantas (Lasat, 2000). Para colmatar estas deficiências estes elementos têm de ser adicionados aos solos em quantidades muito reduzidas através de fertilizantes. Contudo, uma utilização continuada e não controlada pode levar a uma condenação do solo em causa. A aplicação em grandes quantidades de determinados fertilizantes fosfatado pode acrescentar cádmio e outros elementos potencialmente tóxicos, incluindo o mercúrio e chumbo, ao solo (Sumner, 2000).

Os pesticidas também podem ter o papel de aumentar a concentração destes compostos no solo, uma vez que insecticidas e fungicidas contêm Cu, Hg, Mn, Pb e Zn.

O comportamento dos metais no solo é muito complexo, envolvendo vários processos como adsorção-dessorção, complexação-dissociação, oxidação-redução, troca iónica e transporte (Swartjes et al., 2007). Estes mecanismos químicos interagem uns com os outros e no seu conjunto podem controlar o destino dos metais no solo. Os metais pesados entram nos tecidos vegetais, principalmente, através das raízes e folhas, mas a absorção radicular é o caminho mais dominante. Os metais podem ser transferidas da água do solo para as plantas através das raízes sob a forma de iões dissolvidos (por exemplo  $\text{Cd}^{2+}$ ) (McLaughlin et al., 2011).

As plantas entram em contacto com os metais quando os absorvem dos solos contaminados ou quando há a deposição na parte foliar por exposição a ar poluído (Zurera e Moreno, 1984). A acumulação de metais nos tecidos vegetais pode ser influenciada por múltiplos factores, tais como, as propriedades do solo (por exemplo, o pH, quantidade de matéria orgânica, teor de argila e concentração de metais), factores de plantas (por exemplo, tipo de planta) e condições ambientais (ambiente e poluição industrial por exemplo) (Twining et al., 2004). Em particular, o pH do solo parece poder afectar de forma significativa a biodisponibilidade e toxicidade dos metais no solo (Badawy et al., 2002; Wang et al., 2006b). O pH do solo é considerado um dos factores mais importantes que influenciam a transferência de cádmio e chumbo do solo para a planta, valores de pH mais elevados reduzem a biodisponibilidade e toxicidade de Cd e Pb (McBride et al., 1997; Tudorean e Phillips, 2004). O pH do solo também é o maior determinante da solubilidade e mobilidade do crómio e zinco (Speir et al., 2003).

Desta forma, a ausência de uma relação directa entre os teores em metais detectados no solo e nas amostras de produtos hortícolas pode resultar das condições dos vários solos, nomeadamente do seu valor de pH, que pode afectar a mobilidade e solubilidade dos elementos fazendo com que a absorção dos metais possa ser mais elevada em solos com menor grau de contaminação.

Neste contexto, seria conveniente efectuar uma análise mais pormenorizada aos solos que incluísse outros parâmetros físico-químicos, nomeadamente o pH, e que incluísse não só a quantificação total dos metais no solo mas também a quantificação dos metais extraíveis de forma a poder tirar mais conclusões sobre a influência do solo na concentração dos metais nos produtos hortícolas.

#### 1.3.4. Estudo da translocação dos metais na alface

Para se ter uma ideia da translocação dos metais do solo para a planta, foi analisado o teor nos vários elementos em diferentes zonas da alface. Assim, alfaces provenientes da zona da Carrasqueira, colhidas numa fase muito inicial de desenvolvimento, foram separadas em raiz e folhas e cada uma destas fracções foi analisadas individualmente. Os resultados estão presentes na tabela 1.10.

**Tabela 1. 10:** Quantificação dos elementos minerais na parte foliar e raiz de alfaces, bem como no solo colhido nas mesmas zonas.

Zona	Folha (µg/kg) Média ± desvio padrão								
	Cr	Ni	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se
Carrasq. 1	151±14	375±29	3807±134	156±1	106±2	78±1	51375±174	82981±1314	224±22
Carrasq. 2	209±12	300±20	4848±221	96±10	49±1	246±1	32800±594	25480±345	290±22
Carrasq. 3	165±15	193±1	3727±2	135±4	102±1	85±6	37381±1243	23740±62	310±14
Zona	Raiz (µg/kg) Média ± desvio padrão								
	Cr	Ni	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se
Carrasq. 1	209±5	234±3	2760±43	522±26	93±3	918±18	40685±648	38103±401	86±0
Carrasq. 2	214±45	202±2	3790±23	168±12	29±0	670±50	23965±26	8354±99	89±6
Carrasq. 3	172±15	130±8	3362±155	352±18	93±3	1132±15	48148±1973	20703±570	68±1
Zona	Solo (µg/kg) Média								
	Cr	Ni	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se
Carrasq.1	4270	1115	4526	546	<500	4577	<20000	46441	<1000
Carrasq. 2	3628	1186	5590	1092	<500	10172	<20000	24558	<1000
Carrasq. 3	3434	1514	4050	1331	<500	24052	<20000	41298	<1000

Os resultados mostram para todos os elementos minerais analisados um valor muito mais elevado de contaminação do que aquele que tinha sido observado na amostragem anterior (tabela 1.7). Tal diferença resulta da colheita nas duas amostragens ter sido efectuada em fases muito diferentes do desenvolvimento da planta. Assim, enquanto que na primeira amostragem os produtos hortícolas foram analisados na altura de serem colhidos para consumo, nesta amostragem as alfaces foram colhidas quando ainda se encontravam numa fase muito precoce de desenvolvimento.

A análise dos resultados mostra que em relação ao Cr, Ni, As e Pb, a concentração diminui no sentido solo – folhas. De destacar que no caso do Pb e do As a concentração era bastante superior no solo, reduzindo na raiz e conseqüentemente na folha. No caso do Cu, Cd, Zn, Mn e Se a concentração é maior na parte foliar da planta do que na raiz, podendo indicar que a contaminação poderá vir da atmosfera e ficar retida nas folhas, ou ainda uma maior mobilidade destes metais para se deslocarem para a parte aérea da planta. Os resultados são similares aos obtidos por Zhuang, 2009.

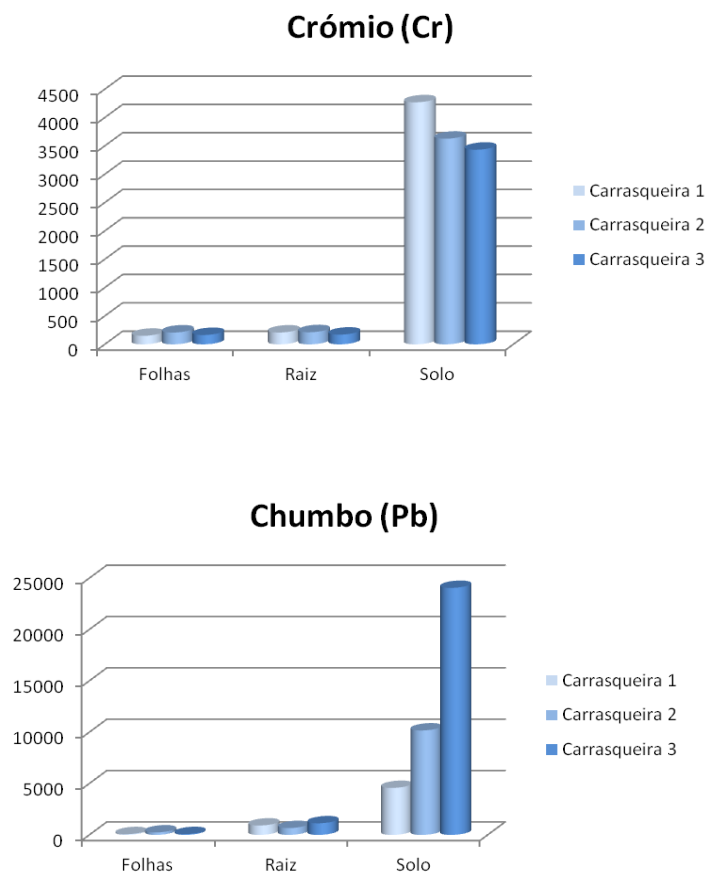
O Factor de Bioconcentração (FBC) pode ser definido como a razão entre a concentração de um elemento numa planta e a concentração do mesmo elemento no solo. O FBC é um importante indicador quantitativo de contaminação de culturas e geralmente tem sido utilizado para estimar a transferência de metais do solo para as plantas (García et al., 2009; Melgar et al., 2009; USEPA 2005). A tabela 1.11 mostra os FBC calculados para cada elemento e para cada grupo de alfaces provenientes das diferentes zonas da Carrasqueira.

**Tabela 1. 11:** Factor de bioconcentração em diferentes alfaces por elemento.

Alface	FBC								
	Cr	Ni	Cu	As	Cd	Pb	Zn	Mn	Se
Carrasqueira 1	0,04	0,34	0,84	0,29	0,21	0,02	2,57	1,79	0,22
Carrasqueira 2	0,06	0,25	0,87	0,09	0,10	0,02	1,64	1,04	0,29
Carrasqueira 3	0,05	0,13	0,92	0,10	0,20	0,00	1,87	0,57	0,31
Média	0,05	0,24	0,88	0,16	0,17	0,01	2,03	1,13	0,27

Segundo os resultados obtidos, os elementos com maior capacidade de transferência do solo para a alface foram o Zn>Mn>Cu, que são os elementos maioritários, quer nas culturas quer nos solos. O seguinte grupo com menor capacidade de transferência do solo para a cultura foi o Se>Ni>Cd>As.

O Cr e o Pb são os elementos com um factor de bioacumulação quase nulo e por isso a transferência do solo para a planta é pouco notória, como é demonstrado na tabela 1.10 em que a concentração destes elementos no solo é muito elevada e da raiz para a folha há um decréscimo muito acentuado, como se pode visualizar graficamente na figura 1.4.



**Figura 1. 4:** Concentração de Cr e Pb (µg/kg) no solo, raiz e folhas de alface nas diferentes zonas de colheita.

### 1.3.5. Análise de Risco

O consumo de frutas e vegetais é a principal via de exposição humana aos metais pesados (McLaughlin et al., 1999; Calderon et al., 2003; Roychowdhury et al., 2003), portanto, é de grandes importância avaliar a extensão da acumulação de metais pesados nas culturas e a partir daí avaliar o risco para as populações que resulta da ingestão diária desses alimentos.

Esta importância prende-se com o facto de ser conhecidos que os metais pesados são capazes de causar efeitos adversos sobre a saúde humana (Davydova, 2005), estando provado que a exposição excessiva a estes compostos conduz ao desenvolvimento de várias doenças (Jarup, 2003). Conforme já anteriormente referido, os metais pesados podem ser classificados como potencialmente tóxicos, como é o caso do arsénio, cádmio ou chumbo, sendo alguns deles essenciais em pequenas quantidades como é o caso do cobre, zinco ou manganês (Zhu et al., 2011).

Apesar das concentrações nestes elementos terem sido de um modo geral baixas, estando, no caso do cádmio e do chumbo, sempre dentro dos valores admitidos por lei, é sabido que a exposição a compostos tóxicos pode ser muito prejudicial mesmo quando estes se encontram em doses muito baixas se a ingestão for muito elevada ou continuada ao longo do tempo (Gopalani et al., 2007; Unak et al., 2007).

Assim, efectuou-se uma análise de risco de exposição a doses elevadas de metais pesados, através do consumo de hortícolas, para as populações em estudo. Para tal foi necessária a realização de questionários de frequência alimentar à população assinalada como de risco, a população da Carrasqueira, e à população da zona de controlo, a população de Vila Nova de Milfontes. A partir das respostas dadas foi necessário transformar essas frequências em factores para ser possível o cálculo do consumo real de cada pessoa.

Foram desenhados posteriormente dois cenários possíveis de exposição, um cenário intermédio e um pior cenário. No cenário intermédio o consumo foi multiplicado pela concentração média do metal pesado presente nos vários legumes e no pior cenário foi usada a concentração máxima do composto nos vários legumes.

Para se obterem os resultados da análise foi necessário confrontar os resultados da ingestão diária de cada metal em estudo para cada indivíduo com os limites máximos admissíveis. Após a realização dessa confrontação para todos os indivíduos em estudo foi possível identificar um indivíduo da Carrasqueira e quatro de Vila Nova de Milfontes que se encontram em situação de risco por, no pior dos cenários, ultrapassarem o limite máximo tolerável de arsénio. Na tabela 1.12 estão presentes essas situações de alerta. Na tabela 1.12, ID representa o número de identificação do indivíduo e IDT a dose diária tolerável de cada elemento por dia e por pessoa.

No pior cenário, os resultados demonstram, para a zona da Carrasqueira, uma criança (C110) em risco devido a ultrapassar os níveis admissíveis de arsénio por dia, no cenário intermédio o valor máximo para o arsénio já não foi atingido. Para a zona de Vila Nova de Milfontes, que se esperava de menor risco para as populações, foram assinaladas três crianças (C057;C017;C066) e um adulto (C052) com valores acima do admissível para a dose diária de arsénio (figura 1.5). Das várias situações assinaladas a da criança C017 é aquela onde o máximo foi mais largamente excedido, tendo-se verificado uma dose diária de arsénio superior ao dobro da dose diária admissível. Para o cenário intermédio esse risco já não se verifica.

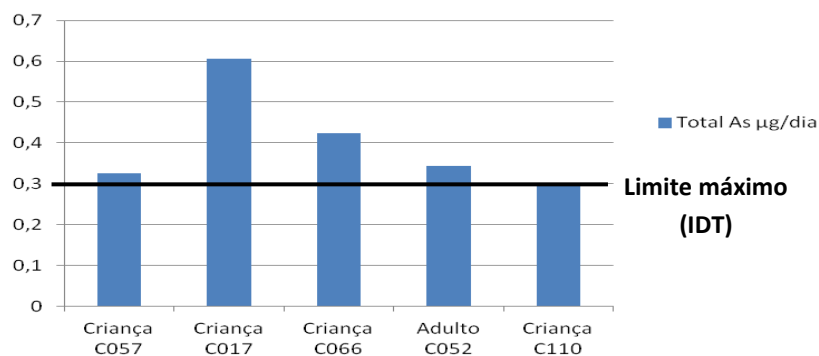


Os restantes elementos estão, em ambos os cenários, relativamente longe de atingir o limite máximo.

**Tabela 1. 12:** Indivíduos em situação de alerta por ultrapassarem o limite máximo tolerável de arsénio.

Zona	ID	Elemento	EDI (µg/kg/dia)		IDT (µg/kg/dia)
			Cenário intermédio	Pior cenário	
Carrasqueira	C110	As	0,14	<b>0,30</b>	0,3 <sup>a</sup>
		Cr	0,10	0,11	0,5 <sup>b</sup>
		Ni	0,13	0,22	22,0 <sup>c</sup>
		Cu	4,61	6,85	71,4 <sup>d</sup>
		Pb	0,03	0,04	3,57 <sup>e</sup>
		Cd	0,03	0,05	0,8 <sup>f</sup>
		Zn	21,70	23,87	300 <sup>g</sup>
Vila Nova de Milfontes	C057	As	0,15	<b>0,33</b>	0,3 <sup>a</sup>
		Cr	0,14	0,11	0,5 <sup>b</sup>
		Ni	0,13	0,24	22,0 <sup>c</sup>
		Cu	0,14	7,57	71,4 <sup>d</sup>
		Pb	0,04	0,04	3,57 <sup>e</sup>
		Cd	0,03	0,05	0,8 <sup>f</sup>
		Zn	23,50	25,47	300 <sup>g</sup>
Vila Nova de Milfontes	C017	As	0,31	<b>0,61</b>	0,3 <sup>a</sup>
		Cr	0,25	0,23	0,5 <sup>b</sup>
		Ni	0,32	0,51	22,0 <sup>c</sup>
		Cu	4,00	14,82	71,4 <sup>d</sup>
		Pb	0,090	0,130	3,57 <sup>e</sup>
		Cd	0,08	0,11	0,8 <sup>f</sup>
		Zn	51,80	61,28	300 <sup>g</sup>
Vila Nova de Milfontes	C066	As	0,20	<b>0,42</b>	0,3 <sup>a</sup>
		Cr	0,18	0,15	0,5 <sup>b</sup>
		Ni	0,18	0,31	22,0 <sup>c</sup>
		Cu	0,40	9,29	71,4 <sup>d</sup>
		Pb	0,05	0,06	3,57 <sup>e</sup>
		Cd	0,04	0,07	0,8 <sup>f</sup>
		Zn	30,68	34,37	300 <sup>g</sup>
Vila Nova de Milfontes	C110	As	0,20	<b>0,34</b>	0,3 <sup>a</sup>
		Cr	0,11	0,13	0,5 <sup>b</sup>
		Ni	0,14	0,21	22,0 <sup>c</sup>
		Cu	0,82	1,99	71,4 <sup>d</sup>
		Pb	0,04	0,06	3,57 <sup>e</sup>
		Cd	0,02	0,03	0,8 <sup>f</sup>
		Zn	12,78	14,99	300 <sup>g</sup>

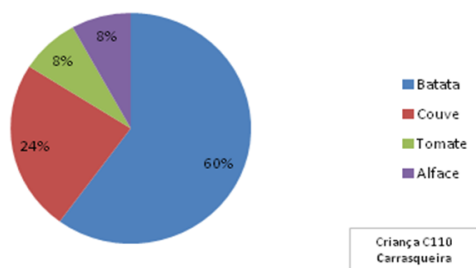
ID: identificação do indivíduo; IDT: dose diária tolerável; <sup>a</sup>EFSA, 2009b; <sup>b</sup>OEHHA, 2010; <sup>c</sup>AFSSA, 2008b e OMS, 2005; <sup>d</sup>SCF, 2006; <sup>e</sup>EFSA, 2010; <sup>f</sup>JECFA, 2011b; <sup>g</sup>OMS e JECFA, 1982.



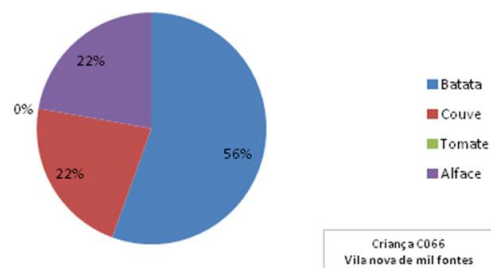
**Figura 1. 5:** Situações de alerta encontrados para as populações das duas zonas assinaladas.

A identificação de qual dos alimentos mais contribuiu para as situações de excesso de arsénio, mostrou que no caso das crianças, quer da Carrasqueira quer de Vila Nova de Milfontes, a batata foi o alimento que mais contribuiu para a quantidade de arsénio, variando esta contribuição de 32 a 80% (figura 1.6). Para o único adulto de Vila Nova de Milfontes que ultrapassou o limite máximo de arsénio, o alimento que mais contribuiu foi a couve que foi responsável por 69% do total da ingestão de arsénio (figura 1.7).

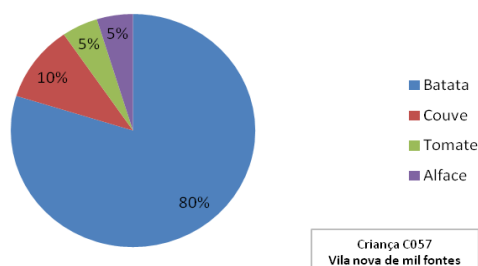
**Total de Arsénio = 0,302 µg/dia**



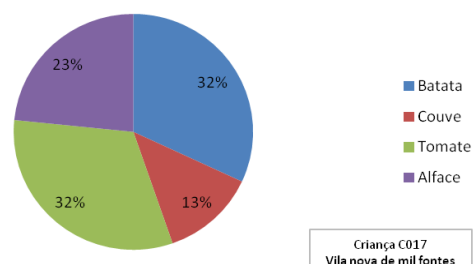
**Total de Arsénio = 0,423 µg/dia**



**Total de Arsénio = 0,326 µg/dia**

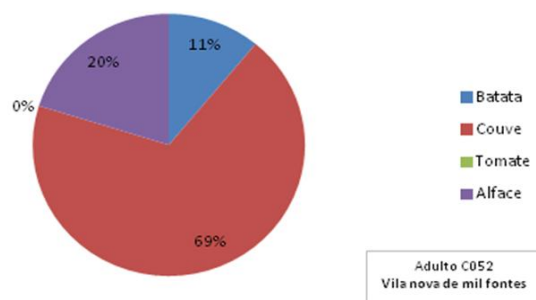


**Total de Arsénio = 0,607 µg/dia**



**Figura 1. 6:** Contribuição percentual dos vários produtos hortícolas em estudo para a dose diária de arsénio nas crianças da Carrasqueira (C110) e de Vila Nova de Milfontes (C066, C057 e C017).

**Total de Arsénio = 0,343 µg/dia**



**Figura 1. 7:** Contribuição percentual dos vários produtos hortícolas em estudo para a dose diária de arsénio no adulto de Vila Nova de Milfontes (C052).

Segundo os resultados obtidos, o grupo mais susceptível são as crianças. Este resultado resulta da elevada quantidade de alimentos que as crianças ingerem em função do seu baixo peso. Esta maior ingestão relativa de alimentos prende-se com a maior necessidade energética que as crianças apresentam por se encontrarem numa fase de crescimento. Assim, uma criança pode ingerir quase a mesma quantidade de alimentos, com a mesma concentração do metal pesado que um adulto, o que faz com que a dose diária ingerida por ambos seja semelhante. Contudo, devido ao menor peso da criança, o seu EDI (µg/kg/dia) vai ser superior ao do adulto. Isto mesmo se pode verificar nas tabelas 1.13 e 1.14, que mostram os valores de EDI máximo e mínimos obtidos para as crianças e adultos na região da Carrasqueira (tabela 1.13) e de Vila Nova de Milfontes (tabela 1.14)

**Tabela 1. 13:** Compilação dos valores máximos e mínimos de EDI ( $\mu\text{g/kg/dia}$ ) nos dois cenários traçados e variações de peso das crianças e adultos na zona da Carrasqueira.

<b>Crianças da zona da Carrasqueira (n=13)</b>						
<b>Peso (kg)</b>		<b>Elemento</b>	<b>EDI cenário intermédio</b>		<b>EDI pior cenário</b>	
<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>		<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
51	14	As	0,03	0,01	0,30	0,01
		Cr	0,10	0,01	0,11	0,01
		Ni	0,13	0,01	0,22	0,01
		Cu	4,61	0,22	6,85	0,24
		Pb	0,03	0,00	0,04	0,00
		Cd	0,03	0,00	0,05	0,00
		Zn	21,74	1,00	23,87	1,20
<b>Adultos da zona da Carrasqueira (n= 89)</b>						
<b>Peso (kg)</b>		<b>Elemento</b>	<b>EDI cenário intermédio</b>		<b>EDI pior cenário</b>	
<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>		<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
105	49	As	0,06	0,00	0,11	0,01
		Cr	0,04	0,00	0,04	0,00
		Ni	0,05	0,00	0,05	0,00
		Cu	1,38	0,00	1,96	0,02
		Pb	0,01	0,00	0,02	0,00
		Cd	0,01	0,00	0,02	0,00
		Zn	6,98	0,17	8,39	0,20

**Tabela 1. 14:** Compilação dos valores máximos e mínimos de EDI ( $\mu\text{g/kg/dia}$ ) nos dois cenários traçados e variações de peso das crianças e adultos na zona de Vila Nova de Milfontes.

Crianças da zona de Vila Nova de Milfontes (n=12)						
Peso (kg)		Elemento	EDI cenário intermédio		EDI pior cenário	
Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo
65	12	As	0,31	0,02	0,61	0,04
		Cr	0,25	0,02	0,23	0,01
		Ni	0,32	0,02	0,51	0,03
		Cu	4,00	0,02	14,82	0,33
		Pb	0,09	0,00	0,13	0,01
		Cd	0,04	0,00	0,11	0,01
		Zn	51,82	3,12	61,28	3,50
Adultos da zona de Vila Nova de Milfontes (n= 88)						
Peso (kg)		Elemento	EDI cenário intermédio		EDI pior cenário	
Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo
105	45	As	0,20	0,01	0,34	0,01
		Cr	0,12	0,01	0,11	0,00
		Ni	0,14	0,01	0,21	0,01
		Cu	0,93	0,02	6,79	0,04
		Pb	2,14	0,00	2,06	0,01
		Cd	0,03	0,00	0,04	0,00
		Zn	21,19	0,93	23,47	1,16

## 2. Avaliação do grau de contaminação de diversos produtos do mar com fragrâncias ou *musks*

### 2.1. Introdução

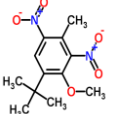
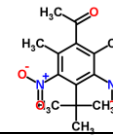
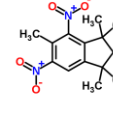
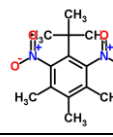
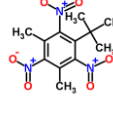
Os *musks* são fragrâncias sintéticas utilizadas em muitos produtos de consumo, como produtos de limpeza e produtos de higiene pessoal (perfumes, loções para aplicar após o barbear, loções para o corpo, champôs, etc.) para garantir o odor agradável (Rimkus, 1999; Kannan et al., 2005; Nakata, 2005; Reiner et al., 2011; Wu, 2012).

Os *musks* são compostos orgânicos lipofílicos e semi-voláteis. A ampla utilização destes compostos provocou a sua dispersão pelo Ambiente e, no início de 1990, foi relatada a sua presença no ar, na água, nos sedimentos, animais selvagens e em seres humanos. A sua distribuição ubíqua no ambiente aquático demonstra a sua persistência e a sua lipofilicidade confere-lhes elevada afinidade para com o tecido adiposo.

Os *musks* apresentam-se em duas classes distintas, os nitro-*musks* e os *musks*-policíclicos. Os nitro-*musks* foram descritos pela primeira vez no final do século XIX por A. Bauer. Nestes compostos sintéticos há a adição de dois ou três grupos nitro ( $\text{NO}_2$ ) e alguns grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ) a uma molécula de benzeno.

Na tabela 2.1 apresentam-se algumas características dos cinco nitro-*musks* mais comuns encontrados na natureza. Assim, na tabela 2.1 pode encontrar-se a fórmula química de cada um dos nitro-*musks*, bem como o seu coeficiente de partição octanol/água ( $K_{OW}$ ), solubilidade em água, ponto de ebulição e ainda dados toxicológicos em organismos aquáticos. O coeficiente de partição octanol/água permite enquadrar o composto de acordo com a sua afinidade para o octanol e para a água definindo assim o seu carácter mais ou menos lipofílico. Quando o  $\log K_{OW}$  é superior a 5, o composto é considerado como muito lipofílico, uma vez que a sua afinidade para com o octanol é superior à sua afinidade para com a água (Geyer et al., 2000). O  $\text{LC}_{50}$  é um parâmetro de toxicidade aguda e representa a dose letal capaz de matar 50% da população exposta. O NOEC (Non Observed Effect Concentration) representa a dose máxima de composto testada que não desencadeou nenhum efeito nos organismos de teste. Os compostos com elevada resistência à degradação física, química ou biológica são compostos muito persistentes no Ambiente, podendo permanecer intactos durante longos períodos de tempo. Um elevado carácter lipofílico e uma elevada persistência são duas características que estão associadas a compostos com elevado potencial de bioacumulação. Os compostos são mais ou menos perigosos e merecedores de alertas segundo o estudo das suas Persistência, Bioacumulação e Toxicidade (PBT).

**Tabela 2. 1:** Identificação e caracterização dos cinco nitro-*musks* mais comuns.

Nome Comum (Abreviatura) CAS Nº Massa molecular	Estrutura química	Log K <sub>OW</sub>	Solubilidade em água (mg/L)	Ponto de ebulição (°C)	Dados toxicológicos (organismos aquáticos)		
					LC <sub>50</sub>	NOEC	*PBT
<b>Musk Ambrette (MA)</b> 83-66-9 268,3		5,7 <sup>d</sup>	Levemente solúvel em etanol <sup>b</sup>	369,3 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a
<b>Musk Ketone (MK)</b> 81-14-1 294,3		4,3 <sup>d</sup>	1,90 <sup>c</sup>	369,0 (760 mmHg)	2,5 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	Não é candidato a substância PBT <sup>a</sup>
<b>Musk Moskene (MM)</b> 116-66-5 278,3		5,8 <sup>d</sup>	0,046 <sup>a</sup>	351,1 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a
<b>Musk Tibetene (MT)</b> 145-39-1 266,3		5,9 <sup>d</sup>	0,052 <sup>a</sup>	391,0 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a
<b>Musk Xylene (MX)</b> 81-15-2 297,2		4,9 <sup>c</sup>	0,49 <sup>c</sup>	392,3 (760 mmHg)	3,75 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	É uma substância PBT <sup>a</sup>

ChemSpider.com; <sup>a</sup>SWECO Environment, 2010; <sup>b</sup>NIST Chemistry WebBook, 2011; <sup>c</sup>Chase, 2012; <sup>d</sup>Osemwengie, 2001.

De entre estes compostos, o *musk tibetene* é o que apresenta maior K<sub>OW</sub> (5,9) e por isso o composto mais lipofílico. O composto com maior solubilidade em água é o *musk ketone*. O *musk* que apresenta maior ponto de ebulição é o *musk xylene*.

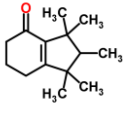
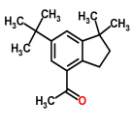
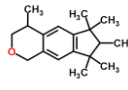
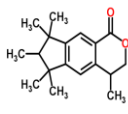
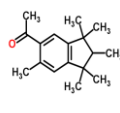
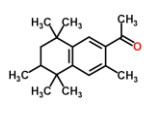
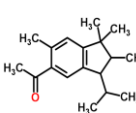
O uso de *musk ambrette* (MA), *musk tibetene* (MT) e *musk moskene* (MM) em produtos cosméticos foi banido na União Europeia, contudo os *musk xylene* (MX) e *musk ketone* (MK) podem ser utilizados mas sujeitos a restrições. Em relação a Portugal estes musks têm limites de utilização. Assim, o MX não pode exceder 1% em perfumes, 0,4% em águas-de-colónia e 0,03% em outros produtos cosméticos. Para o MK os valores permitidos são um pouco mais altos, sendo que para perfumes o valor limite é 1,4%, em águas-de-colónia é 0,56% e 0,042% em outros produtos cosméticos. Os produtos de higiene oral podem não conter estes compostos (Decreto-lei nº 189/2008).

Os *musks*-policíclicos foram introduzidos na indústria em 1950. Estes *musks* são derivados de tetralina e indano, substituídos por vários grupos metilo (Rimkus, 1999).

Vários *musks*-policíclicos foram introduzidos em produtos de limpeza e higiene, contudo os que se encontram em maiores concentrações são o *galaxolide* (HHCB) e o *tonalide* (AHTN) (Bester, 2009)

Na tabela 2.2 pode encontrar-se a fórmula química dos seis *musks*-policíclicos mais estudados, bem como o seu coeficiente de partição octanol/água ( $K_{OW}$ ), solubilidade em água, ponto de ebulição e ainda dados toxicológicos em organismos aquáticos.

**Tabela 2. 2:** Identificação e caracterização dos seis *musks*-policíclicos mais comuns.

Nome Comum (Abreviatura) CAS Nº Massa molécular	Estrutura química	Log $K_{OW}$	Solubilidade em água (mg/L)	Ponto de ebulição (°C)	Dados toxicológicos (organismos aquáticos)		
					LC <sub>50</sub>	NOEC	*PBT
<b>Cashmeran</b> (DPMI) 33704-61-9 206,3		4,9 <sup>b</sup>	0,17 <sup>b</sup>	286,1 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a
<b>Celestolide</b> (ADBI) 13171-00-1 244,3		6,6 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	309,1 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a
<b>Galaxolide</b> (HHCB) 1222-05-5 258,4		5,9 <sup>b</sup>	1,75 <sup>b</sup>	326,3 (760 mmHg)	0,29 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	Não é candidato a substância PBT <sup>a</sup>
<b>Galaxolidone</b> (HHCB-Lactona) 507442-49-1 272,4		5,3 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	384,1 (760 mmHg)	600 <sup>a</sup>	n.a	É uma substância PBT <sup>a</sup>
<b>Phantolide</b> (AHMI) 15323-35-0 244,3		6,7 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	336,6 (760 mmHg)	n.a	0,04 <sup>a</sup>	n.a
<b>Tonalide</b> (AHTN) 1506-02-1 258,4		5,7 <sup>b</sup>	1,25 <sup>b</sup>	356,8 (760 mmHg)	255 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	n.a
<b>Traseolide</b> (ATII) 68140-48-7 258,4		8,1 <sup>b</sup>	0,09 <sup>b</sup>	350,0 (760 mmHg)	n.a	n.a	n.a

ChemSpider.com; <sup>a</sup>SWECO Environment, 2010; <sup>b</sup>Chase, 2012.



Conforme se pode observar na tabela 2.1, *traseolide* é o *musk* com maior  $K_{OW}$  (8,1), enquanto o *galaxolide* é o que apresenta maior solubilidade em água. O *galaxolide* não é considerado uma substância PBT, devido à evidência de degradação no ambiente aquático, uma vez que a monitorização ao longo dos anos revelou uma tendência decrescente da concentração de deste composto em lamas, água, material em suspensão, biota e sedimentos (European Commission, 2008). O *galaxolidone* é um metabolito gerado durante a biodegradação do *galaxolide*. Contudo, ao contrário do composto original, o metabolito *galaxolidone* é considerado uma substância PBT, por ser persistente, bioacumulável e tóxica. A transformação de *galaxolide* *galaxolidone* é conhecida e tem sido investigada em diversos estudos que elucidaram as diferentes etapas de degradação (Rimkus, 1999).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença destas substâncias em vários organismos das cadeias alimentares aquáticas (tabela 2.3) (Nakata, 2005; Kannan et al., 2005; Nakata, 2007), amostras de sangue (Reiner et al., 2007; Schiavone et al., 2010) e tecido adiposo humano e ainda leite materno (Kannan et al., 2005; Schiavone et al., 2010; Reiner et al., 2011). Desta forma, o controlo de todas estas substâncias é relevante e prioritário devido ao seu potencial de bioacumulação e também devido a demonstrarem potencial de desregulação endócrina (Chase et al., 2012)

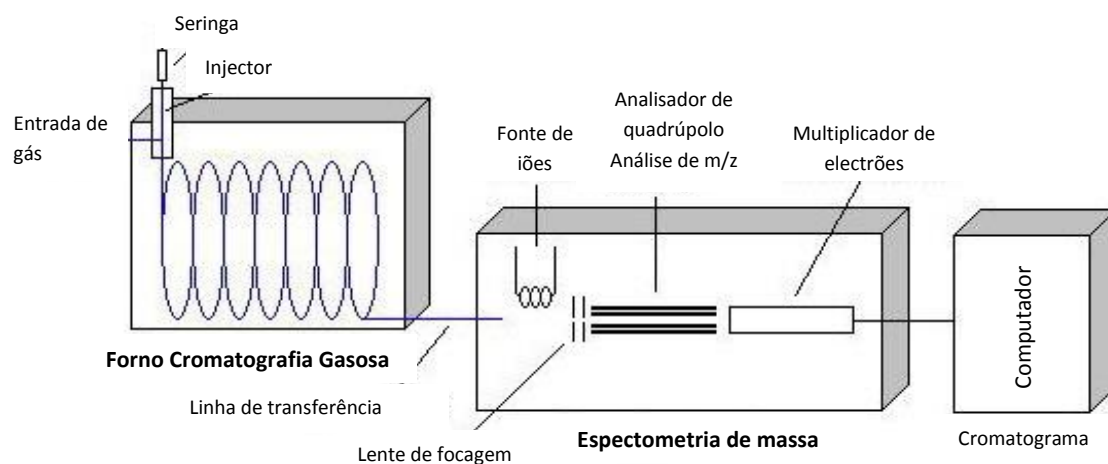
**Tabela 2. 3:** Organismos aquáticos em que foi detectada a presença de musks e respectiva concentração.

Organismo Nome científico	Concentração encontrada (ng/g)	Referência
Búzios <i>Gastropod potamopyrgus</i>	HHCB: 86-64200	Pedersen et al., 2009
Anelídeo do mar <i>Polychaete capitella</i>	HHCB: 1460-168190	Ramskov et al., 2009
Salmão do atlântico <i>Salmo salar</i>	HHCB: 1-3,2 AHTN: 1-1,6	Kannan et al., 2005
Peixe <i>Micropterus dolomieu</i>	HHCB: 4,3-5,4 AHTN: 1,6-1,9	Kannan et al., 2005
Tubarão martelo, <i>Sphyrna mokarran</i>	HHCB: 16-48 AHTN: < 9,1	Nakata, et al., 2005
Enguia (Fígado) <i>Anguilla anguilla</i>	HHCB: 30-4800 AHTN: 20-2300	Fromme et al., 2001
Enguia (Músculo) <i>Anguilla anguilla</i>	HHCB: 34 AHTN: 17	Gatermann et al., 1999
Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	HHCB: 1,4-4,5 AHTN: 1,4-3,6	Osemwengie et al., 2001
Raia <i>Platyrrhinoidis triseriata</i>	HHCB: 8,3 AHTN: 1,2	Kallenborn et al., 1999
Hadoque <i>Melanogrammus aeglefinus</i>	HHCB: 1,5-250 AHTN: 1,1-23	Kallenborn et al., 1999
Bacalhau do Atlântico <i>Gadus morhua</i>	HHCB: 0,14-530 AHTN: 0,24-760	Kallenborn et al., 1999
Bacalhau Paloco <i>Pollachius virens</i>	HHCB: 2,6-5,2 AHTN: 0,37-2,1	Kallenborn et al., 1999
Truta de viveiro <i>Salmo trutta</i>	HHCB: 0,52-53 AHTN: 0,44-16	Duedahl-Olesen et al., 1999

### 2.2.1. Detecção de *Musks*-Sintéticos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS)

São muitos os métodos de análise para a determinação de *musks* sintéticos em amostras ambientais, a maioria deles com base na análise por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC/MS) devido ao carácter semi-volátil destes compostos. Antes de poderem ser analisadas por GC/MS, é crucial que as amostras sofram uma preparação adequada com a finalidade de remover compostos que possam vir a interferir com a detecção desejada, reduzindo assim a eficácia dos resultados e/ou a vida útil da coluna. Normalmente a gordura presente nas matrizes gera grandes interferências sendo indispensável a sua remoção prévia. Assim, dependendo do tipo de matriz e das características do composto a analisar, a amostra entra no GC/MS depois de ter sofrido uma fase de extracção e de uma fase de limpeza (“clean-up”).

Uma técnica é tanto melhor quando maior a sensibilidade e mais baixos os limites de detecção para elementos traço como os *musks*. Normalmente isso consegue-se recorrendo a cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa (MS). Esta ligação permite a diferenciação das interferências da matriz e uma identificação e quantificação simultânea dos analitos (Fernández-González et al., 2008). Na Figura 2.1 estão representados os principais componentes de um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa.



**Figura 2. 1:** Esquema do GC/MS (Adaptado de Skoog et al., 2007).

A possibilidade de aplicar grande volume de injeção (LVI do inglês *large volume injection*) é um pré-requisito excelente para a determinação de componentes vestigiais, porque aumenta a sensibilidade e reduz a necessidade de pré-concentração do extracto para a análise (Jeroen e Hans, 1996; Hoh e Mastovska, 2008).

O injector PTV é semelhante a um injector convencional porque, em ambos os sistemas, a amostra é injectada para o interior de um dispositivo térmico.

No entanto, o injector PTV é equipado com uma função de controlo da temperatura muito sofisticado e pode ser rapidamente aquecido ou arrefecido durante a injeção, enquanto que o injector de separação convencional é isotérmico. O injector PTV permite um controlo da temperatura, pressão e caudal a que a amostra está sujeita e é uma mais valia para a análise de amostras complexas e com baixas concentrações do analito, porque a entrada do PTV permite a eliminação do solvente e desse modo uma pré-concentração do analito, também permite a transferência desse para a coluna por acção de vapor. O controlo da temperatura do injector diminui as perdas por volatilização dos compostos de baixo peso molecular e a discriminação de compostos de elevado peso molecular, melhorando também a focagem na entrada da coluna analítica. Assim, quando a amostra é sujeita a um procedimento de limpeza antes da análise é possível uma eliminação mais eficiente de interferências da matriz recorrendo a um PTV-LVI (Ángel et al., 2013).

No procedimento de análise por GC a amostra é introduzida a baixa temperatura (sempre abaixo do ponto de ebulição do solvente usado). O solvente é eliminado, em condições definidas como óptimas, enquanto os analitos são retidos no revestimento à entrada da coluna. A entrada do PTV é rapidamente aquecida (até 12 °C/segundo) e os analitos retidos são transferidos para a coluna analítica, mantendo a temperatura do forno abaixo da temperatura de ebulição do solvente para reorganizar os analitos na parte da frente da coluna. Por último, após a transferência dos componentes de interesse, há a abertura da válvula para remover o vapor do solvente residual e compostos de matriz de baixa volatilidade para fora do sistema.

A implementação de um PTV pode levar à eliminação completa das etapas de pré-concentração de amostras contendo compostos vestigiais (Ángel et al., 2013), contudo a optimização dos parâmetros não é fácil e estes devem ser cuidadosamente ajustados às matrizes em estudo, de modo a obter resultados confiáveis e reproduzíveis.

#### **2.2.2. Metodologias de preparação das amostras para detecção de *Musks*-Sintéticos por GC/MS**

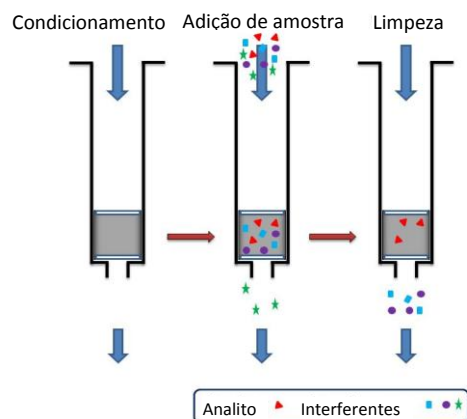
O método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) foi introduzido em 2003 por Anastassiades e colaboradores. Inicialmente este método foi desenvolvido para a análise de pesticidas em alimentos, contudo foi possível adaptar este método a outros compostos e outras matrizes. O método QuEChERS apresenta várias vantagens, tais como o facto de envolver o uso de pequenas quantidades de solventes, da maioria dos solventes usados serem pouco poluentes e tóxicos, de permitir a redução significativa de contaminações nas amostras, uma vez que o material usado é descartável e muito fácil de manusear, e, adicionalmente, de apresentar baixos custos e rapidez de análise.

O método apresenta duas fases essenciais e indispensáveis antes da análise no GC/MS: a primeira fase é a extracção dos compostos da amostra para o solvente de extracção usado; a segunda fase é chamada fase de limpeza (“clean-up”) e tem como finalidade reduzir as interferências, uma vez que em amostras biológicas estão presentes gorduras e outras moléculas de elevado peso molecular que têm de ser separadas do analito de interesse. A fase de limpeza minimiza o efeito de matriz, levando a resultados mais consistentes e reproduzíveis. Em análise, a presença de gordura leva a resultados com baixa precisão e repetibilidade devido à deformação evidente dos picos (Gerhard et al., 1997).

Em ambas as etapas há a adição de sais, com funções diferenciadas, que facilitam a extracção e a limpeza da matriz. Na fase de extracção adiciona-se o sulfato de magnésio, que funciona como agente secante e remove a água residual, uma vez que a amostra é usada liofilizada; O cloreto de sódio, que permite a modificação da matriz aumentando a disposição dos constituintes da amostra e o citrato de sódio e o citrato dissódico hidrogenado que controlam o pH da matriz evitando variações do pH. As aminas primárias e secundárias (PSA) eliminam açúcares, ácidos gordos polares, ácidos orgânicos polares e pigmentos polares presentes na matriz. O octadecílico (C18) tem a função de remover as substâncias interferentes não polares, como alguns lípidos (Wilkowska e Biziuk, 2011).

A técnica usada designa-se extracção em fase sólida dispersiva (d-SPE). Esta técnica caracteriza-se pela poupança de tempo, esforço e solventes, não requer aparelhos nem utensílios, tais como cartuchos, vácuo, secagem nem fase de evaporação de solvente, garante maiores recuperações e resultados mais reproduzíveis e ainda melhor interacção entre a amostra, os solventes e os sais usados comparando com a SPE tradicional (Ciešlik et al., 2011; Wilkowska e Biziuk, 2011). A grande preocupação desta técnica reside na escolha de um solvente que capte os compostos de interesse e não os componentes da matriz que causam interferência, como gorduras ou açúcares. (Skoog et al., 2007; Wilkowska e Biziuk, 2011).

Na figura 2.2 está esquematizado o procedimento de d-SPE. Numa primeira fase é efectuado o acondicionamento do tubo, onde é adicionado o solvente e os sais que vão auxiliar a extracção; na seguinte fase ocorre a adição da amostra no mesmo tubo. Nesta fase, no solvente encontram-se retidos não só o analito de interesse mas alguns interferentes, por isso, é necessária uma terceira etapa, com novos sais “clean-up” para que ocorra a limpeza das interferências e no solvente apenas fiquem os compostos de interesse. A figura 2.3 mostra o aspecto dos Kit QuEChERS.



**Figura 2. 2:** Esquema ilustrado de d-SPE (adaptado de Paolo et al., 2012).



**Figura 2. 3:** Kit QuEChERS (Waters, 2014).

### 2.2.3. Enquadramento e objectivos do segundo capítulo

Os *musks* sintéticos são contaminantes alimentares emergentes que importa controlar devido especialmente ao seu potencial de bioacumulação e de desregulação endócrina. Neste contexto, o objectivo do presente capítulo foi o de avaliar o nível de diferentes matrizes alimentares, todas de origem marinha, com sete destas substâncias: o *celestolide* (ADBI), *phantolide* (AHMI), *traseolide* (ATII), *galaxolide* (HHCB), *tonalide* (AHTN), *musk ketone* (MK) e *musk xylene* (MX). Com o objectivo de avaliar a situação ao longo do tempo e em diferentes zonas da Europa a amostragem foi realizada em anos e localizações diferentes.

Para atingir este objectivo foi necessário começar por implementar e validar o método de extracção/quantificação destas substâncias em ostras e mexilhão, salmão (músculo, fígado e gónadas) e em enguias de vidro.

Este trabalho teve ainda como objectivo avaliar o potencial de bioacumulação de dois destes compostos, o *galaxolide* (HHCB) e o *tonalide* (AHTN), em enguias de vidro.

## 2.2 Materiais e Métodos

### 2.2.1. Produtos Químicos e Reagentes

O acetonitrilo e o Acetato de etilo usados para a preparação das soluções padrões e como solventes orgânicos no procedimento do QuEChERS foram adquiridos a Fluka®Analytical e Sigma-Aldrich respectivamente. O sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato de sódio, citrato dissódico hidrogenado, aminas primárias e secundárias e octadecílico estão incorporados no kit de QuEChERS obtido pela Agilent Technologies – Agilent Bond Elut. As soluções padrão sólidas de fragrâncias sintéticas, 1,3,4,6,7,8-hexa-hidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta[g]-2-benzopirano (*galaxolide*) (75%), 7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexametiltetralina (*tonalide*), 6,7-di-hidro-1,1,2,3,3-pentametil-4(5H)-indanona (*cashmeran*), 4-acetil-1,1-dimetil-6-tert-butilindano (*celestolide*), 6-acetil-1,1,2,3,3,5-hexametilindano (*phantolide*) foram obtidas pela LGC Standards (Barcelona, Espanha) com 99% pureza, com exceção do *galaxolide* com aproximadamente 25% de Ftalato de dietilo (DEP). O 1-(ters-butil)-3,4,5-trimetil-2,6-dinitrobenzeno (*musk tibetene*) foi adquirido em solução de 10 mg /L em ciclohexano pela mesma empresa. O 4-aceto-3,5-dimetil-2,6-dinitro-ters-butilbenzeno (*musk ketone*) foi adquirido a partir de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha) com 99% e 98% de pureza, respectivamente. O 2,4,6-trinitro-1,3-dimetil-5-terc-butilbenzeno (*musk xylene*) foi obtido da Sigma -Aldrich (St. Louis, USA) a 100 mg/L em acetonitrilo. Para o controlo de qualidade foi necessário o uso de um padrão interno, o *Musk xylene* D15 (mx-d15) adquirido igualmente em Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha) com 100 ng/μl em acetona. Por último, o 4,6,6,7,8,8-Hexamethyl-4,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[g]isochromen-1(3H)-one (*galaxolidone*) foi adquirido por parte da LGC Standards (Molsheim, France), com uma pureza de 53,5%.

### 2.2.2. Preparação das soluções padrão

Para cada *musk* de concentração 1000ppm foi adicionado o solvente para uma concentração final de 10ppm. A solução mix foi preparada a partir dessas soluções a 10ppm para um volume final de 1500μL, considerando a solução final com uma concentração de 1ppm. O padrão interno ([2H15]-MX) a 1ppm foi preparado a partir de uma solução de 10ppm para um volume final de 1000μL. Para a curva de calibração foram usados os seguintes pontos: 0, 5, 25, 50, 100ppb para um volume final de 1500 μL e uma concentração inicial de 1000ppb. Como o método tinha de ser validado para os dois solventes foram feitas soluções em acetonitrilo e em Acetato de etilo. As soluções foram armazenadas e preservadas a -20 °C.

### 2.2.3. Amostras Analisadas

Foi analisado um total de 106 amostras de ostras, mexilhões, salmão e enguias de vidro. As ostras e mexilhões foram apanhados entre 2013 e 2014 em Portugal, Espanha e França, nas zonas assinaladas na figura 2.4.



**Figura 2. 4:** Mapa dos pontos de colheita das amostras de ostras (Monperrus, 2012).

As amostras de salmão analisadas foram capturadas e liofilizadas entre 1995 e 2011 em dois rios franceses, Nivelles e Bidassoa. Para cada amostra de salmão foi analisado em separado o músculo ( $n=29$ ), fígado ( $n=28$ ) e gónadas ( $n=28$ ).

Em relação às enguias de vidro, foram apanhadas em 2014 e mantidas vivas num aquário para uma posterior dopagem com 1000 ng de *galaxolide* e 100 ng de *tonalide* por litro de água. Após serem sujeitas a essa contaminação foram retiradas em diferentes períodos de tempo: T0 (retiradas após a contaminação), T1 (retiradas 1 dia depois da contaminação), T7 (retiradas 7 dias depois da contaminação) e T14 (retiradas após 14 dias de contaminação).

Na tabela 2.4 encontra-se uma descrição mais pormenorizada das amostras analisadas.

**Tabela 2. 4:** Descrição das várias amostras analisadas

Biota	Número de Amostras
Ostras e mexilhões	9
Salmão Músculo	29
Salmão Fígado	28
Salmão Gónadas	28
Enguias de vidro	8
Água do aquário	4
<b>Total</b>	<b>106</b>

## 2.2.4. Preparação das Amostras

Foram testadas várias hipóteses para a preparação das amostras, que conduziu ao desenvolvimento e validação do método. Em seguida apresenta-se o método usado e considerado óptimo para as amostras em estudo. Numa primeira fase pesou-se (balança AG 204 Mettler Toledo) para um tubo de extracção 0,2g da amostra a analisar, previamente liofilizada e triturada de forma a garantir uma boa homogeneidade. Em seguida, adicionou-se 1mL de acetonitrilo e 5µL do padrão interno ([<sup>2</sup>H<sub>15</sub>]-MX). Agitou-se manualmente durante um minuto e, de seguida, colocou-se em banho de ultrasons (8510 Branson) durante 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se à adição dos sais de extracção: 170mg de citrato de sódio, 83mg de citrato dissódico hidrogenado, 667mg de sulfato de magnésio e 170mg de cloreto de sódio. Procede-se novamente a uma agitação manual durante um minuto e centrifugou-se (TermoScientific®-Espresso centrifuge) durante 10 minutos a 3700rpm. O sobrenadante (líquido com os analitos de interesse reparado dos vários sais usados para a extracção) foi recolhido para um segundo tubo e iniciou-se a fase de limpeza. Para tal, adicionaram-se 25mg de aminas primárias e secundárias, 25mg de octadecílico e 150mg de sulfato de magnésio. Finalmente procedeu-se a uma nova agitação manual durante um minuto seguida de centrifugação durante 10 minutos a 3700rpm. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi recolhido para um frasco de vidro para análise no LVI-PTV-GC/MS. A figura 2.5 mostra um esquema simplificado do procedimento.

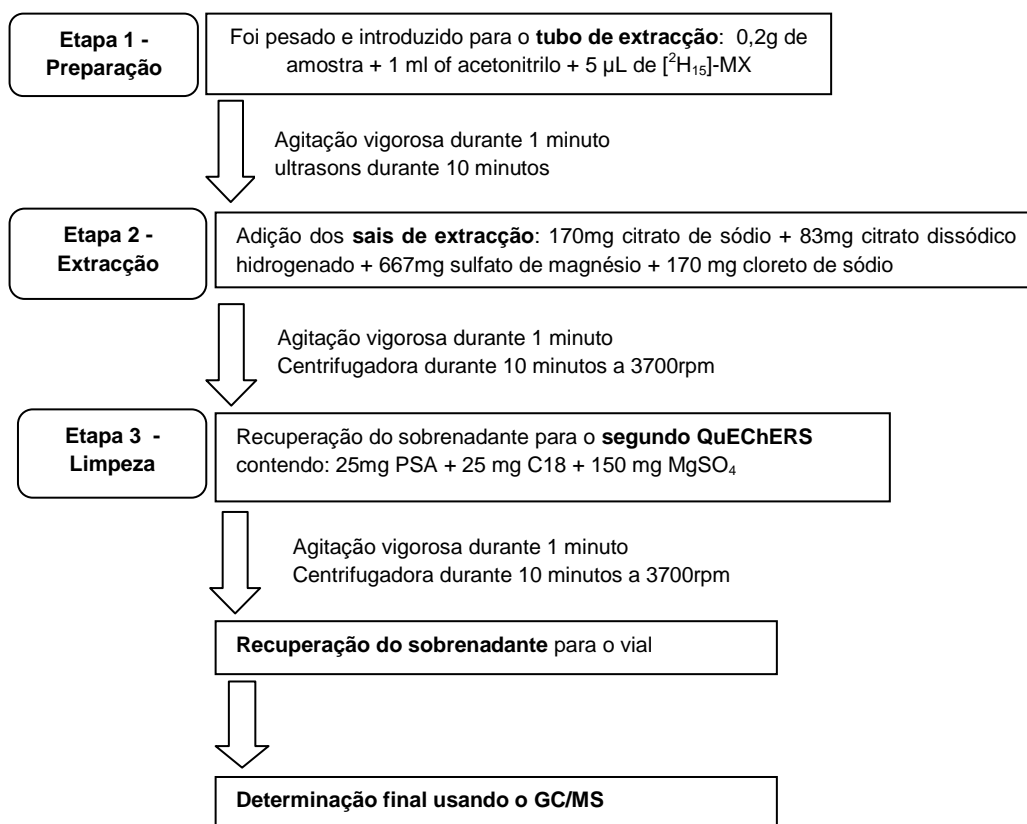


Figura 2. 5: Fluxograma do método de QuEChERS.



### 2.2.5 Análise instrumental

As condições do PTV-GC/MS (Agilent Technologies 7890A GC system) para a determinação e quantificação dos compostos de interesse estão descritas pormenorizadamente na tabela 2.5. Para esta análise é de grande importância o conhecimento do composto, quer do tempo de retenção quer da massa/carga ( $m/z$ ) do ião alvo para a análise em GC/MS. Essas características para cada composto a analisar estão presentes na tabela 2.6. Os iões qualitativos permitem indicar se o pico que se está a integrar é realmente o pico do composto de interesse.

**Tabela 2. 5:** Condições do PTV-GC/MS usadas para a análise.

GC	Coluna	HP-5MS, 5% fenil metil siloxano (Agilent 19091S-433)
	Programa de temperatura do forno	Começa a 65°C e mantém durante 2 min, segue a aumentar 30°C.min <sup>-1</sup> até 190°C, segue 5°C.min <sup>-1</sup> até 290°C e mantém por 5 min. Total da corrida: 33 min.
	Fluxo de gás (árgon)	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
PTV	Volume de amostra	50 µL
	Programa da temperatura de injeção	65 °C por 4 min (ACN) ou 60°C por 3 min (EtOAc), segue-se 72°C.min <sup>-1</sup> até 300 °C durante 29 min.
	Pressão	4,351 psi em 4 min (ACN e EtOAc)
	Caudal	75 mL.min <sup>-1</sup>
	Válvula de purga do injector	75 mL.min <sup>-1</sup> em 5,5 min (ACN) ou em 4,5 min (EtOAc)
Interface	Temperatura de interface	310°C
EI-MS	Energia de ionização	70 eV
	Temperatura da fonte	230 °C
	Temperatura do quadrupólo	150 °C
	Tempo de permanência	80 ms para DPPI, ADBI, AHMI, MA, MM, MK 50 ms para ATII, MX, HHCB, AHTN, [2H15]-MX

**Tabela 2. 6:** Caracterização do composto a analisar com o tempo de retenção, m/z do íão alvo e dos qualitativos

Analito	Tempo de retenção (min.)	Íão alvo	Íões qualitativos
<i>Celestolide</i> (ADBI)	10,498	229	173 + 244
<i>Phantolide</i> (AHMI)	10,847	229	187 + 171
<i>Musk Ambrette</i> (MA)	11,924	253	268 + 254
<i>Traseolide</i> (ATII)	11,619	215	258 + 173
<i>Galaxolide</i> (HHCB)	11,680	243	258 + 213
<i>Tonalide</i> (AHTN)	11,772	243	258 + 159
<i>Musk Moskene</i> (MM)	12,013	263	278 + 264
<i>Musk Ketone</i> (MK)	13,001	279	294 + 280
<i>Musk Xylene</i> (MX)	11,764	282	283
[2H15]-MX	11,634	294	207

### 2.2.6 Controlo de Qualidade

Os *musks* sintéticos podem estar presentes em todo o lado, mesmo nas bancadas de laboratório, por isso é necessário uma maior disciplina dos manipuladores das amostras. Por outro lado, as quantidades a determinar são vestigiais e por isso podem ser falsas se o cuidado não for o adequado. Os tubos usados devem ser descartáveis e devem evitar-se lavagens com detergentes para excluir a possibilidade de contaminações. Para garantir que os tubos de QuEChERS usados pela primeira vez não contribuem para a concentração em *musks* sintéticos é necessária a realização de brancos experimentais, assim, é necessário a realização de todo o procedimento com a ausência de amostra

Nos brancos foram detectadas concentrações de *celestolide*, *galaxolide*, *tonalide* e *musk ketone* de 0,01; 0,11; 0,03 e 0,01 µg/L respectivamente. No tratamento de dados esse valor foi tido em conta e subtraído de todas as amostras.

Em substituição do cálculo para o limite de detecção, foi calculado o MDL (limite de detecção do método), que consiste na seguinte fórmula:

MDL =  $s \times t_{(n-1; 1-\alpha=0.99)}$ , em que:

n = número de réplicas de brancos (7 no mínimo); s = desvio padrão dos resultados obtidos e t = valor do t student com n-1 graus de liberdade e 99% de nível de confiança.

Em todas as amostras foi adicionado o padrão interno (PI) numa concentração de 10ppb. O PI é um composto que se adiciona à amostra, antes de qualquer manipulação, neste caso antes da extracção, para não interferir com a análise. O PI tem a função de corrigir possíveis imprecisões durante a manipulação da amostra como na fase de extracção, injeção da amostra, concentração do analito por evaporação do solvente ou variações no equipamento de análise. O PI também tem a função de monitorizar possíveis erros do operador no procedimento durante a análise. A escolha do PI deve ter em conta as seguintes características: não pode ser um composto presente na amostra, deve ter elevado grau de pureza, deve originar picos com boa e fácil identificação e ter características semelhantes aos analitos a estudar.

O controlo externo passou pela realização de uma calibração instrumental, uma calibração procedimental e uma calibração com adição padrão.

Para as diferentes calibrações foram usadas soluções mix com os vários *musk* sintéticos nas seguintes concentrações: 5, 25, 50 e 100ppb.

#### **2.2.7. Desenvolvimento do Método**

Para chegar à validação do método, houve vários parâmetros a estudar e testar. Esses parâmetros foram: Em primeiro lugar o solvente de extracção (se acetonitrilo ou Acetato de etilo) e o rácio entre a massa de amostra e o volume do solvente de extracção (se 0,5g de amostra/3mL de solvente ou 0,2g de amostra/1ml de solvente).

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1 Validação do Método

#### 2.3.1.1. Tipo de Solvente de Extração

Para a fase de extração foi implementada a metodologia QuEChERS para a determinação de *musks* em amostras biológicas, aplicação completamente pioneira. Foram testados dois solventes de extração, acetonitrilo (ACN) e Acetato de etilo (EtoAC). Após se realizar o procedimento experimental e se analisar os resultados, a escolha do solvente incidiu na comparação das percentagens de recuperação (% recuperação), das percentagens do desvio relativo (%RSD) e na linearidade ( $r^2$ ) da curva de calibração. Para a linearidade da curva foram tidas em conta as concentrações: 5, 50 e 100 ng/g. Os resultados estão apresentados nas tabelas 2.7 e 2.8.

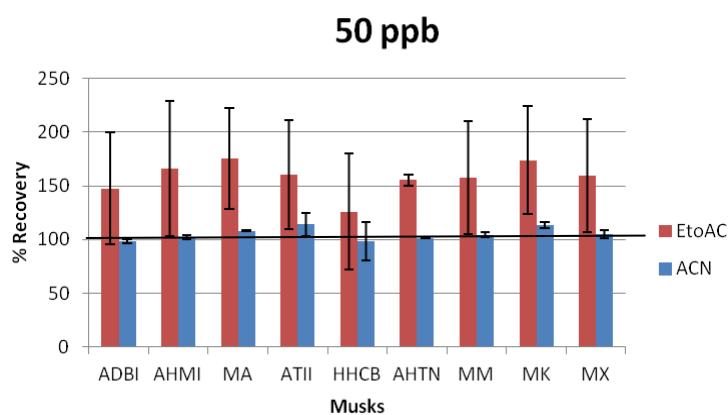
**Tabela 2. 7:** Teste do solvente de extração – resultados da linearidade e RSD.

Analito	%RSD							
	Linearidade ( $r^2$ )		EtOAc			ACN		
	ACN	EtoAC	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb
ADBI	0,9998	0,9986	17	52	18	6	2	0
AHMI	0,9998	0,9991	19	63	25	3	2	3
MA	0,9967	0,9893	22	47	27	1	0,4	6
ATII	0,9931	0,9993	25	51	23	6	11	2
HHCB	0,9969	0,9832	-	54	14	18	18	4
AHTN	0,9999	0,9890	-	5	29	7	0	3
MM	0,9987	0,9999	22	53	27	9	2	4
MK	0,9899	0,9938	22	50	25	9	3	7
MX	0,9981	0,9998	10	53	29	6	4	7

**Tabela 2. 8:** Teste do solvente de extracção – resultados da percentagem de recuperação.

Percentagem de recuperação						
Analito	EtOAc			ACN		
	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb
ADBI	29	148	173	89	98	101
AHMI	15	166	169	89	102	100
MA	-	176	172	63	108	98
ATII	9	161	170	193	114	97
HHCB	-	126	176	85	99	102
AHTN	-	155	165	147	101	100
MM	10	158	170	107	104	99
MK	-20	174	167	120	113	96
MX	6	159	170	46	105	98

Perante os resultados obtidos, o solvente escolhido para ser adicionado na fase de extracção dos analitos de interesse foi o acetonitrilo (ACN). Como se pode visualizar na figura 2.6, este solvente apresenta melhores percentagens de recuperação e melhores percentagens de RSD do que o outro solvente testado, o Acetato de etilo (EtoAC). A linearidade foi muito semelhante nos dois solventes, mas para o ACN foi ligeiramente superior que para o EtoAC.

**Figura 2. 6:** Valores da percentagem de RSD e de recuperação entre os dois solventes testados para a concentração de 50 ppb.

### 2.3.1.2. Rácio Massa de Amostra/Volume de Solvente

A otimização deste rácio é de grande importância, uma vez que se a quantidade de amostra for extremamente elevada para o volume de solvente adicionado, pode ocorrer a saturação do solvente e, desta forma, muitos dos analitos podem não ser retirados da amostra e perdem-se. Por outro lado, a saturação do solvente dificulta também as etapas posteriores de recuperação do sobrenadante e limpeza do conteúdo removido para o solvente. Pelo contrário, se o conteúdo da amostra for muito reduzido para a quantidade de solvente usada, pode não ser possível encontrar o analito após a análise devido as suas concentrações vestigiais nas amostras em estudo.

Perante estes problemas que podem surgir foram testados dois rácios diferentes para o solvente já escolhido por apresentar melhores resultados: 0,5g de amostra para 3mL de acetonitrilo e 0,2g de amostra para 1mL de acetonitrilo.

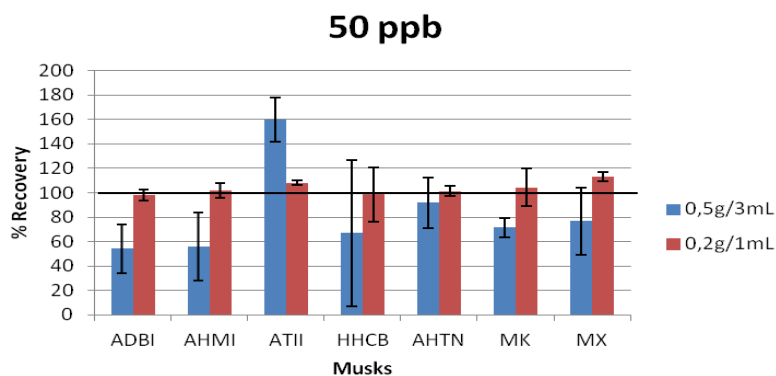
Para a tomada de decisão foram comparadas as percentagens de recuperação. A percentagem de recuperação é um factor muito importante porque indica se a concentração inicial adicionada corresponde à concentração final analisada, isto é, quanto mais próximo o valor for de 100%, maior a eficácia do solvente em remover a concentração que foi adicionada na amostra para testar o rácio massa de amostra para volume de solvente. Assim, um valor próximo de 100% indica quer que o volume de solvente foi suficiente para remover a concentração do analito adicionada na amostra e, conseqüentemente, remover os analitos presentes naturalmente nas amostras a analisar.

Na tabela 2.9 apresentam-se as percentagens de recuperação e as % RSD encontradas para os dois rácios testados.

**Tabela 2. 9:** Valores da percentagem de recuperação e de RSD dos dois rácios em estudo.

% Recuperação							%RSD						
Acetonitrilo (ACN)													
0,5g/3mL				0,2g/1mL			0,5g/3mL			0,2g/1mL			
Analito	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb	
ADBI	64	54	57	89	98	101	12	20	25	9	4	10	
AHMI	52	56	51	89	102	100	15	28	17	21	6	16	
ATII	209	160	150	63	108	98	18	18	51	15	2	11	
HHCB	171	67	108	85	99	102	18	60	9	16	22	17	
AHTN	127	92	102	147	101	100	19	21	22	10	4	16	
MK	101	71	60	107	104	99	21	8	28	13	16	7	
MX	107	77	69	120	113	96	22	27	34	4	4	1	

Perante os resultados obtidos, e como se pode rapidamente visualizar na figura 2.7, que apresenta, como exemplo, os resultados para a concentração de 50 ppb, dos dois rácios testados o melhor é o de 0,2g de amostra para 1mL de acetonitrilo.



**Figura 2. 7:** Valores de percentagem de RSD e de recuperação para os dois rácios estudados para a concentração de 50 ppb.

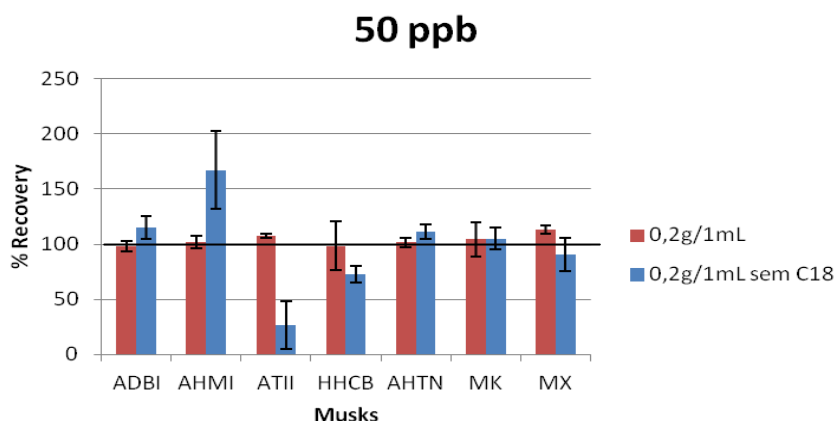
### 2.3.1.3. Método de Limpeza

Nesta fase de validação do método, surgiu a possibilidade de testar se a fase de limpeza (“clean-up”) da amostra funcionaria melhor com ou sem C18 (octadecílico). Os resultados foram comparados igualmente através das percentagens de recuperação e de RSD, como está presente na tabela 2.10.

**Tabela 2. 10:** Valores da percentagem de recuperação e de RSD dos dois métodos de limpeza testados

% Recuperação							%RSD					
Acetonitrilo (ACN)												
0,2g/1mL				0,2g/1mL sem C18			0,2g/1mL			0,2g/1mL sem C18		
Analit o	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb	5 ppb	50 ppb	100 ppb
ADBI	89	98	101	78	115	98	9	4	10	12	10	16
AHMI	89	102	100	-	167	75	21	6	16	24	35	13
ATII	63	108	98	237	27	122	15	2	11	24	22	33
HHCB	85	99	102	28	73	103	16	22	17	19	8	1
AHTN	147	101	100	108	111	97	10	4	16	4	6	4
MK	107	104	99	99	105	98	13	16	7	41	10	36
MX	120	113	96	73	90	99	4	4	1	21	15	1

Os resultados mais satisfatórios foram obtidos com o C18, como se pode observar graficamente na figura 2.8 para a concentração de 50 ppb. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que o C18 tem a função de remover interferências da amostra, como, por exemplo, os lípidos, e por isso conseguem-se obter picos melhores e resultados mais satisfatórios.



**Figura 2. 8:** Valores de percentagem de RSD e de recuperação entre os dois métodos estudados na fase de limpeza para a concentração de 50 ppb.

### 2.3.2. Quantificação dos *Musks* nas Várias Amostras Analisadas

A calibração instrumental usada, as curvas de calibração com adição de padrão e os limites de detecção do método (MDL) encontram-se no Anexo I.

#### 2.3.2.1. Ostras e mexilhões

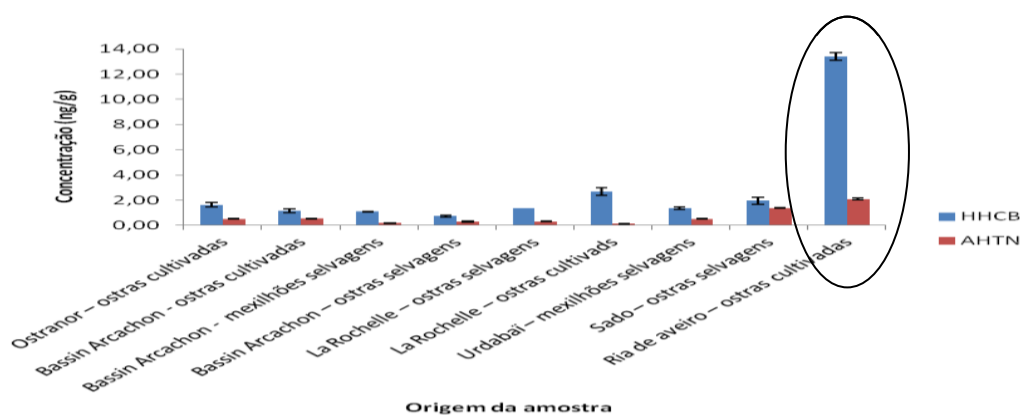
Após todo o procedimento de preparação da amostra, os diversos *musks* em análise foram quantificados por LVI-PTV-GC/MS nas ostras e mexilhões. Os resultados desta análise encontram-se na tabela 2.11.



**Tabela 2. 11:** Resultados da quantificação dos *musks*, em ng/g, nas ostras e mexilhões.

Local de colheita	Analito (ng/g + s.d)						
	ADBI	AHMI	ATII	HHCB	AHTN	MK	MX
Ostranor – ostras cultivadas	0,0	0,0	0,0	1,6±0,2	0,5±0,0	0,0	0,0
Bassin Arcachon - ostras cultivadas	0,0	0,0	0,0	1,2±0,2	0,5±0,0	0,0	0,0
Bassin Arcachon - mexilhões selvagens	0,0	0,0	0,2±0,0	1,1±0,0	0,2±0,0	0,0	0,0
Bassin Arcachon – ostras selvagens	0,0	0,0	0,0	0,7±0,1	0,3±0,0	0,0	0,0
La Rochelle – ostras selvagens	0,0	0,0	0,0	1,4±0,0	0,3±0,0	0,0	0,0
La Rochelle – ostras cultivads	0,0	0,0	0,0	2,7±0,3	0,1±0,0	0,0	0,0
Urdabai – mexilhões selvagens	0,0	0,0	0,0	1,4±0,1	0,5±0,0	0,0	0,0
Sado – ostras selvagens	0,0	0,0	0,0	2,0±0,3	1,4±0,0	0,0	0,0
Ria de Aveiro – ostras cultivadas	0,0	0,0	0,4±0,0	13,4±0,3	2,1±0,1	0,0	0,0

Como se pode observar, os dois compostos maioritários nestas amostras foram o *galaxolide* (HHCB) e o *tonalide* (AHTN). Pelos resultados obtidos, pode constatar-se que as ostras provenientes da ria de Aveiro são as que estão mais contaminadas por *musks* sintéticos, especialmente por *galaxolide* e *tonalide*, com uma concentração cerca de dez vezes superior à das restantes amostras analisadas. Tendo em conta apenas os compostos maioritário, foi traçado um gráfico em que se visualiza a diferença no grau de contaminação entre as várias amostras (figura 2.9).

**Figura 2. 9:** Concentração de *galaxolide* e *tonalide* nas amostras de ostras e mexilhões de diferentes origens.

Aparentemente as ostras cultivadas têm concentrações superiores destes compostos maioritários que as ostras selvagens, com a excepção das ostras selvagens colhidas no rio Sado em Portugal, que têm uma concentração superior comparando a algumas amostras de ostras cultivadas, como é o caso das ostras apanhadas na região de Ostranor e Bassin Arcachon.

### **2.3.2.2. Salmão**

Numa tentativa de estudar a distribuição destes compostos no salmão, de acordo com as percentagens de gordura nas várias partes do corpo, sentiu-se a necessidade de repartir o salmão e proceder a uma análise individual dessas mesmas partes. Assim, no mesmo, organismo analisou-se o músculo, gónadas e fígado de forma individual para cada animal. As expectativas iniciais eram de que a concentração do composto seria mais elevada em zonas com maior percentagem de gordura, uma vez que os *musks* são bioacumuláveis e lipofílicos. Desta forma, uma vez que o músculo tem uma característica mais fibrosa que as outras partes do salmão analisadas, a perspectiva inicial seria a destes analitos se encontrarem em quantidades mais reduzidas no músculo do que no fígado e gónadas.

#### **2.3.2.2.1 Músculo de Salmão**

As amostras foram analisadas, no mesmo dia da preparação, recorrendo ao LVI-PTV-GC/MS. Para diferenciar as amostras adoptou-se a seguinte denominação: Em primeiro lugar a data da pesca do indivíduo (dia/mês/ano), em seguida o seu comprimento e no fim a indicação do género (f – feminino; m – masculino). Os resultados da análise do músculo de salmão encontram-se na tabela 2.12.

**Tabela 2. 12:** Resultados da quantificação dos *musks*, nas amostras de músculo de salmão.

Data de Colheita - Comprimento	Analito (ng/g $\pm$ desvio padrão)						
	ADBI	AHMI	ATII	HHCB	AHTN	MK	MX
<b>Zona de Nivelles, França</b>							
27/12/1995 – 71,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
29/10/1997 – 61,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,4 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
06/11/2002 – 66 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,5
04/04/2004 – 59 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,6
06/12/2006 – 74 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
07/12/2006 – 58 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1
07/12/2006 – 60 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
10/12/2006 – 63 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
13/12/2006 – 61 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
05/11/2007 – 62,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
13/12/2007 – 73 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1
14/12/2007 – 69 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,2
17/12/2008 – 64 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
30/12/2009 – 60,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
01/02/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
02/02/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
02/02/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 67 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
08/12/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 61,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
31/10/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
05/12/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
06/12/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
06/12/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
05/03/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Zona de Bidassoa, França</b>							
02/01/2005 – 68cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
02/01/2005 – 63 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1
02/01/2005 – 59 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
24/12/2008 – 62 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0

Tal como verificado com as ostras e mexilhões, também no caso do músculo de salmão os compostos maioritários foram o *galaxolide* e o *tonalide*. Com a excepção das amostras com a identificação 27/12/1995 – 71,5 cm – m, 29/10/1997 – 61,5 cm – f e 06/11/2002 – 66 cm – f, os valores de *galaxolide* foram sempre superiores aos valores de *tonalide*.

O *musk ketone* apenas aparece em duas amostras identificadas como 06/11/2002 – 66 cm – f e 04/04/2004 – 59 cm – m, que apresentam igualmente a maior concentração para o *musk xylene* (1,3 ng/g) comparando com a concentração máxima obtida pelas restantes amostras de 0,9 ng/g.

Não foi notória qualquer relação entre a concentração do analito e o sexo do salmão, mas pelo contrário as concentrações dos analitos tendem a diminuir com o avanço dos anos.

É de destacar o músculo do salmão com a identificação: 05/11/2007 – 62,5 cm – m que apresenta um valor extremamente superior de galaxolide (4,7 ng/g) comparando com as restantes amostras.

Os valores para as amostras de Bidassoa, variando de 0,5 a 2,6 ng/g, não são os esperados, uma vez que, apesar de se tratar de uma zona considerada menos poluída, apresenta valores superiores à maioria das restantes amostras.

#### **2.3.2.2.2 Gónadas de Salmão**

As amostras foram analisadas, no mesmo dia da preparação, recorrendo ao LVI-PTV-GC/MS. A denominação das amostras adoptada foi a mesma já descrita para o caso do músculo com a diferença de quando necessário e devido à grande quantidade de gónadas se acrescentou a designação G1 e G2 antes da indicação do género (f – feminino; m – masculino).

Os resultados da análise das gónadas de salmão estão apresentados na tabela 2.13.

**Tabela 2. 13:** Resultados da quantificação dos *musks*, nas amostras de gónadas de salmão.

Data - Comprimento	Analito (ng/g $\pm$ desvio padrão)						
	ADBI	AHMI	ATII	HHCB	AHTN	MK	MX
<b>Zona de Nivelles, França</b>							
29/10/1997 – 61,5 cm - G1 - f	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,3	9,7 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1
29/10/1997 – 61,5 cm - G2 - f	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,3	9,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,4
06/11/2002 – 66 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	10,5 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,4
04/04/2004 – 59 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,2
06/12/2006 – 74 cm - G1 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	13,4 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,5
06/12/2006 – 74 cm - G2 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	11,4 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,3
07/12/2006 – 58 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1
07/12/2006 – 60 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1
10/12/2006 – 63 cm - G1 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,2
10/12/2006 – 63 cm - G2 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	8,5 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,3
13/12/2006 – 61 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1
05/11/2007 – 62,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	5,7 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
23/11/2007 – 55,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	9,8 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2
13/12/2007 – 73 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1
14/12/2007 – 69 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
30/12/2009 – 60,5 cm – G1 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	22,3 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,1
30/12/2009 – 60,5 cm – G2 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	25,8 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,1
01/02/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
02/02/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 67 cm – G1 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1
29/10/2011 – 67 cm – G2 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 61,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,2
31/10/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
05/03/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Zona de Bidassoa, França</b>							
02/01/2005 – 68cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
02/01/2005 – 63 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1
02/01/2005 – 59 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
24/12/2008 – 62 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0

Tal como verificado com as ostras e mexilhões e músculo de salmão, também no caso das gónadas de salmão os compostos maioritários foram o *galaxolide* e o *tonalide*. Nestas amostras, o *galaxolide* apresentou sempre valores superiores ao *tonalide*. É relevante dar destaque às gónadas do peixe pescado a 30/12/2009 – 60,5 cm-f, uma vez que apresentam uma concentração de *galaxolide* muito superior (22,3 e 25,8 ng/g) à das restantes amostras analisadas. Esta diferença não se manteve nos restantes *musks* sintéticos que apresentaram valores semelhantes aos verificados nos outros peixes.

No ano de 1997 há uma proximidade maior entre a concentração de *galaxolide* e de *tonalide* e essas são relativamente altas.

Foi apenas neste ano que foram detectadas concentrações de *celestolide* e *phantolide*.

Em 14 anos, houve uma variação na concentração de *galaxolide* de 2,2 a 25,8 ng/g, na concentração de *tonalide* de 0,4 a 9,7 ng/g, na concentração de *musk ketone* de 0,0 a 0,4 ng/g e na concentração de *musk xylene* de 0,0 a 2,4 ng/g. Desta forma pode concluir-se que ao longo dos anos em análise (1997 a 2011), o composto com maiores variações foi o *galaxolide*, seguindo-se o *tonalide*. Esta tendência mantém-se, embora de modo menos acentuado, se se excluir o peixe pescado a 30/12/2009 – 60,5 cm, que conforme anteriormente referido, se destaca por apresentar uma concentração de *galaxolide* muito superior à dos restantes peixes analisados.

Apesar da informação do comprimento do peixe, não foi possível estabelecer uma relação entre o comprimento e a concentração de *musks* sintéticos nas gónadas. Pelo contrário, e sem nenhum suporte de artigos científicos, foi notório que os peixes do sexo feminino apresentaram uma maior concentração de *galaxolide* e de *tonalide* que os do sexo masculino. Assim, a concentração de *galaxolide*, tendo em conta só as fêmeas, variou de 2,8 a 25,8ng/g e a concentração de *tonalide* de 1,4 a 9,7 ng/g. Já considerando apenas os machos, a concentração de *galaxolide* variou de 2,1 a 5,7 ng/g e a de *tonalide* de 0,4 a 1,4 ng/g. Tendo em conta apenas o valor mínimo e máximo do *galaxolide* e *tonalide* nas fêmeas e nos machos é extremamente notória a diferença na acumulação dos compostos dependendo do género do peixe.

Comparando os resultados entre as duas zonas de pesca, Nivelles e Bidassoa, é possível concluir que a zona menos poluída por *musks* sintéticos é a Bidassoa, uma vez que as concentrações dos analitos, em especial o *galaxolide* são menores. Uma vez que os peixes pescados em Bidassoa eram todos machos, e como se verificou uma diferença entre géneros, as fêmeas pescadas em Nivelles foram excluídas desta comparação.

#### 2.3.2.2.3. Fígado de Salmão

O fígado apresenta variadas funções importante no organismo, desempenhando uma função preponderante na purificação e destoxificação de compostos estranhos ao organismo. Desta forma, a análise do fígado reveste-se da maior importância. As amostras foram analisadas, no mesmo dia da preparação, recorrendo ao LVI-PTV-GC/MS, apresentando-se os resultados na tabela 2.14.

**Tabela 2. 14:** Resultados da quantificação dos *musks*, nas amostras de fígado de salmão.

Data - Comprimento	Analito (ng/g $\pm$ desvio padrão)						
	ADBI	AHMI	ATII	HHCB	AHTN	MK	MX
<b>Zona de Nivelles, França</b>							
29/10/1997 – 61,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
06/11/2002 – 66 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	4,9 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
04/04/2004 – 59 cm - m	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,1	41,2 $\pm$ 1,8	8,5 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,2
06/12/2006 – 74 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
16/12/2006 – 58 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
07/12/2006 – 60 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
10/12/2006 – 63 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
13/12/2006 – 61 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	12,6 $\pm$ 3,2	2,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
05/11/2007 – 62,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
23/11/2007 – 55,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
13/12/2007 – 73 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
14/12/2007 – 69 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1
17/12/2008 – 64 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
30/12/2009 – 60,5 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
01/02/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
02/02/2011 – 49014 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
02/02/2011 – 49631 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 67 cm - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
29/10/2011 – 61,5 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
31/10/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	5,6 $\pm$ 2,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
05/12/2011 - f	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
06/12/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
07/12/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
05/03/2011 - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Zona de Bidassoa, França</b>							
02/01/2005 – 68cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
02/01/2005 – 63 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
02/01/2005 – 59 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
24/12/2008 – 62 cm - m	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 1,8	0,9 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0

Os resultados demonstram uma ausência de *celestolide*, *phantolide* e *musk ketone* nos fígados dos peixes analisados. Para o *traseolide* e para o *musk xylene* as concentrações foram mais elevadas entre 1997 e 2004, variando de 0,5 a 1,3ng/g e de 0,1 a 1,3ng/g, respectivamente. O *galaxolide* e o *tonalide* nestas amostras também foram os compostos maioritários, variando as suas concentrações de 0,0 a 41,2 ng/g e 0,1 a 8,5 ng/g, respectivamente. Também para estes dois compostos se verifica uma tendência para a diminuição da concentração a partir de 2004.

Os peixes com a identificação: 13/12/2006 – 61 cm – m e 31/10/2011 – m, são exceção a esta tendência apresentando concentrações em *galaxolide* bastante superiores (de 12,6 e 5,6 ng/g, respectivamente) às encontradas nos restante peixes pescados a partir de 2004.

É de salientar nos resultados anteriormente apresentados para as ostras e mexilhões e para as gónadas de salmão a concentração de *galaxolide* foi sempre superior à concentração de *tonalide*, contudo, no caso das amostras de músculo e fígado de salmão, nem sempre isso se verificou, como exemplo: No músculo de salmão, o peixe com a designação 06/11/2002 – 66 cm – f, apresenta uma concentração de 2,4 ng/g de *galaxolide* e de 4,4 ng/g de *tonalide*; No fígado de salmão, o peixe com a designação 29/10/1997 – 61,5 cm – f, apresenta uma concentração de 2,4 ng/g de *galaxolide* e de 3,8 ng/g de *tonalide*.

Os resultados mostram ainda uma ausência de relação entre o grau de contaminação no músculo, fígado e nas gónadas dos vários peixes. Por exemplo, o peixe pescado a 30/12/2009 – 60,5 cm - f, apresenta nas gónadas uma concentração de *galaxolide* muito superior à dos restantes peixes analisados e apresenta no músculo e no fígado uma das mais baixas concentrações encontradas.

Pelo contrário, o peixe com a codificação 04/04/2004 – 59 cm - m, apresentou uma das concentrações mais elevadas de *galaxolide* detectada nas amostras de fígado (41,2 ng/g) e também uma das concentrações mais elevadas no músculo (4,1 ng/g), apresentando nas gónadas uma das concentrações mais baixas deste composto.

Em relação ao comprimento e ao género dos peixes, os resultados mostraram a ausência de relação entre estes factores e a concentração em *musks* sintéticos no fígado. Quanto às zonas de pesca, à semelhança do que se verificou com as análises às gónadas, a zona de Nivelles voltou a indicar uma contaminação com *galaxolide* maior do que a zona de Bidassoa, com a excepção do peixe com a identificação: 24/12/2008 – 62 cm – m, que foi o único dos peixes pescados nesta zona, que apresentou contaminação com este composto, com uma concentração relativamente elevada (3,4 ng/g).

Comparando as concentrações encontradas para os compostos maioritários nas várias amostras de salmão (músculo, fígado e gónadas), de uma forma geral o músculo foi o que apresentou menor contaminação com um intervalo de *galaxolide* de 0,2 a 4,7 ng/g e de *tonalide* 0,0 a 4,4 ng/g, seguindo-se as amostras das gónadas de salmão, variando a concentração de *galaxolide* 0,0 a 25,8 ng/g e de *tonalide* 0,4 a 9,7 ng/g. As amostras de fígado de salmão foram as que apresentaram maior contaminação como era o esperado, devido à sua função de desintoxicar o organismo e também devido à presença de elevadas percentagens de gordura que facilita a acumulação destes compostos, com uma variação de *galaxolide* de 0,0 a 41,2 ng/g e de *tonalide* 0,0 a 8,5 ng/g.



### 2.3.2.3 Ensaio com as Enguia de vidro

#### 2.3.2.3.1 Enguias de Vidro

A importância do estudo da enguia de vidro advém dos seus hábitos alimentares e da mudança de *habitats* que realiza durante a sua vida. Assim, a etapa de desova é feita no oceano Atlântico deslocando-se posteriormente os organismos para os rios. Durante esse período, a alimentação é feita pelas reservas que foram acumulando.

Neste trabalho as enguias de vidro foram utilizadas num ensaio de dopagem que permitiu, por um lado, traçar a cinética de acumulação de *galaxolide* e *tonalide* por parte do organismo e, por outro lado, identificar o metabolito resultante do *galaxolide* (HHCB) o *galaxolidone* (HHCB-lactona).

No ensaio de dopagem a água dos aquários foi contaminada com 1000ng de *galaxolide* e 100ng de *tonalide* por litro de água e as enguias foram retiradas em diferentes períodos de tempo: T0 (retiradas após a contaminação), T1 (retiradas 1 dia depois da contaminação), T7 (retiradas 7 dias depois da contaminação) e T14 (retiradas após 14 dias de contaminação). A análise foi realizada no mesmo dia da preparação, recorrendo ao LVI-PTV-GC/MS, apresentando-se os resultados, na tabela 2.15. Para cada tempo retiraram-se vários organismos que foram analisados em dois grupos (amostras 1 e 2 para cada um dos tempos).

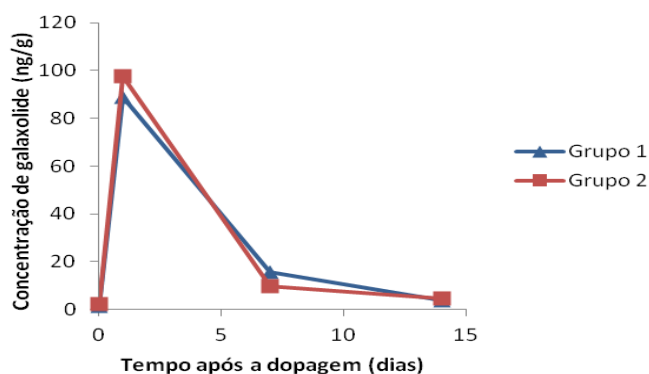
**Tabela 2. 15:** Resultados da quantificação dos *musks*, nas amostras de enguia de vidro

Amostras	Analito (ng/g $\pm$ desvio padrão)							HHCB-lactona
	ADBI	AHMI	ATII	HHCB	AHTN	MK	MX	
T0 - 1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,5
T0 - 2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,3
T 1 - 1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	88,9 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,3
T1 - 2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	97,5 $\pm$ 1,6	10,4 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,1
T 7 - 1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	15,6 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 0,1
T7 - 2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	9,8 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,1
T 14 - 1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 0,2
T14 - 2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,6 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0

Para estes organismos apenas foram detectadas concentrações de *galaxolide*, *tonalide* e *galaxolidone*.

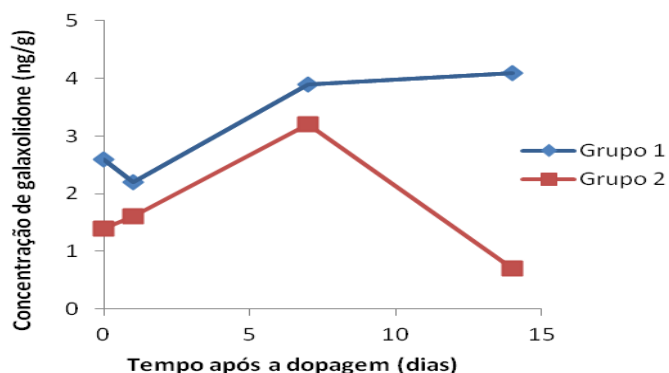
No tempo zero (T0), momento em que se retiram as enguias imediatamente após a contaminação dos aquários, as concentrações de *galaxolide*, variaram de 1,6 a 2,4 ng/g.

No tempo um (T1), um dia após a contaminação, essa concentração já variou de 88,9 a 97,5 ng/g, valores muito superiores ao T0. Passados 7 dias (T7) foram retiradas mais enguias e a análise mostrou uma diminuição da concentração de *galaxolide*, com os valores a variar de 9,8 a 15,6 ng/g. No final do ensaio, passados 14 dias (T14), os valores variaram de 3,8 a 4,6, o que indica uma continuação da redução da concentração de *galaxolide* nos organismos. A figura 2.10 mostra a cinética para o *galaxolide*, construída com os dados obtidos.



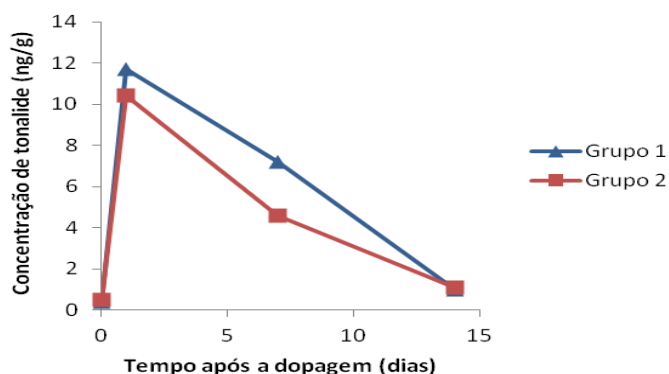
**Figura 2. 10:** Cinética de acumulação/remoção do *galaxolide* nas enguias de vidro. HHCB1 e HHCB2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados.

A análise da concentração de *galaxolidone* revela um perfil diferente. Assim, a concentração deste composto tem um aumento muito acentuado entre os tempos T1 e T7, ou seja no intervalo de tempo em que o *galaxolide* apresenta um decréscimo acentuado, a concentração do seu metabolito aumenta (figura 2.11). Contudo, a concentração do metabolito nunca atinge níveis que se aproximem dos atingidos pelo composto original. Esta diferença pode indicar uma maior velocidade de excreção do metabolito, uma pequena taxa de biotransformação ou que o *galaxolidone* possa ainda sofrer metabolização adicional.



**Figura 2. 11:** Cinética de acumulação/remoção do *galaxolidone* nas enguias de vidro. HHCB-lactona1 e HHCB-lactona 2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados.

Para o *tonalide*, verificou-se que no tempo zero (T0) a concentração variou de 0,4 a 0,5 ng/g. No tempo um (T1), a concentração deste composto variou de 10,4 a 11,7 ng/g, valores muito superiores ao T0. Passados 7 dias (T7) a análise mostrou uma variação de 4,6 a 7,2 ng/g. No final do ensaio (T14), os valores de concentração de *tonalide* variaram de 1,0 a 1,1. Deste modo, tal como verificado para o *galaxolide*, também com o *tonalide* se verificou um aumento inicial da concentração seguido de uma fase de redução (figura 2.12).



**Figura 2. 12:** Cinética de acumulação/remoção do *tonalide* nas enguias de vidro. AHTN1 e AHTN2 representam os dois conjuntos em que se dividiram os organismos analisados.

#### 2.3.2.3.2. Água do Aquário

Para analisar a distribuição dos compostos em estudo entre a água e a enguia de vidro, os compostos *galaxolide* e *tonalide* foram doseados na água do aquário nos mesmos tempos em que se efectuou a análise das enguias, ou seja nos tempos 0, 1, 7 e 14. Os resultados das análises à água do aquário encontram-se na tabela 2.16. Estes dados foram gentilmente cedidos pela Doutora Joana Cavalheiro (Cavalheiro, J., 2014).

**Tabela 2. 16:** Resultados das análises à água do aquário (ppb) para os tempos 0, 1, 7 e 14.

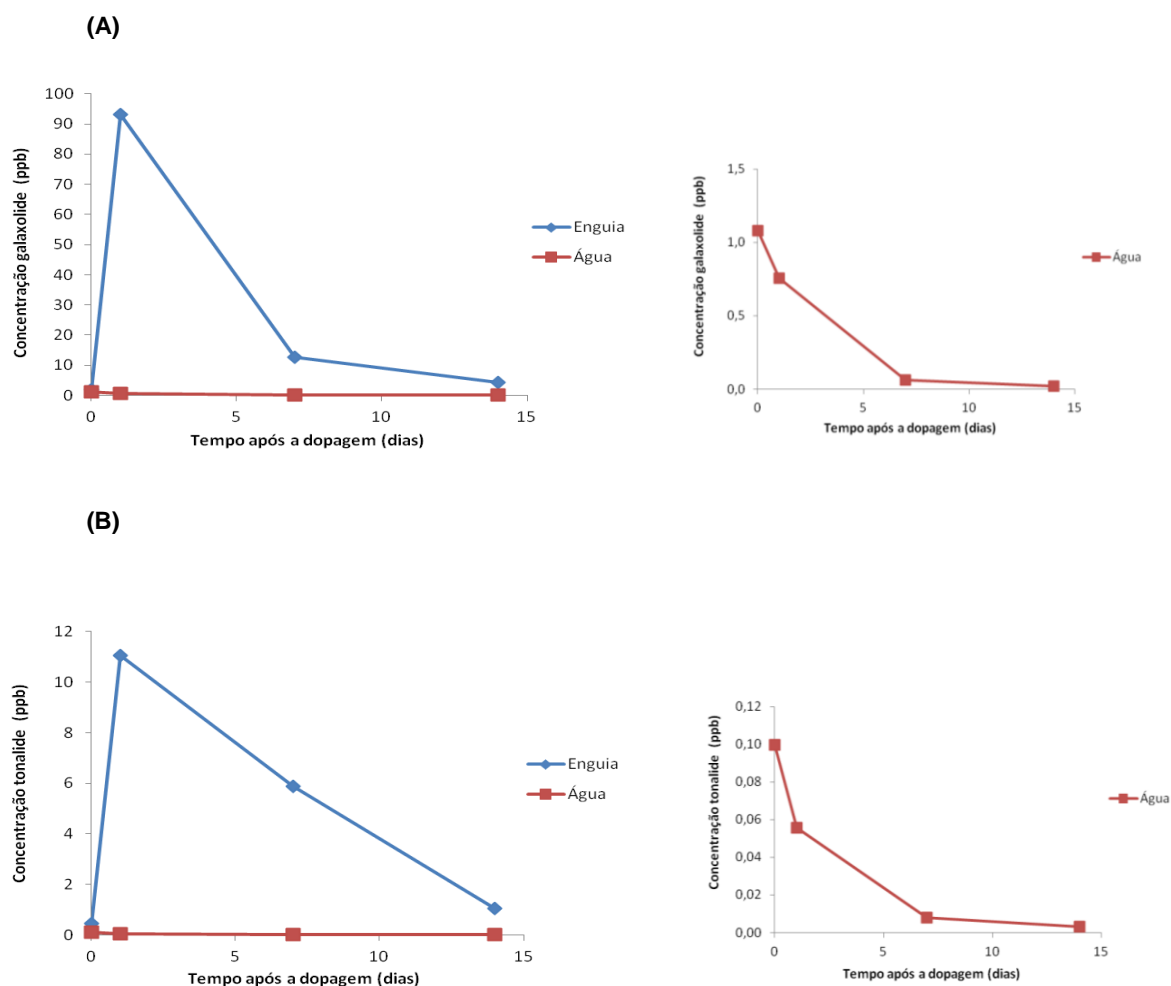
Analito	T0	T1	T7	T14
HHCB	1,078	0,754	0,062	0,019
AHTN	0,100	0,056	0,008	0,003

Os resultados mostram que a concentração de ambos os compostos foi diminuindo ao longo do tempo. Esta observação pode resultar não só da absorção destes compostos por parte das enguias de vidro, que ficou demonstrada no ponto anterior, mas também destes dois

compostos se poderem ir degradando na água originando diferentes metabolitos.

A comparação das concentrações de ambos os compostos na água e nos organismos mostra uma grande diferença de valores. Assim, as concentrações de HHCB e de AHTN na água foram sempre bastante inferiores às suas concentrações nas enguias de vidro (figura 2.13). Não é claro que a concentração na água diminua com o aumento da concentração na enguia de vidro.

A concentração de ambos os compostos na água sofreu um decréscimo acentuado entre os tempos T0 e T7, período em que nas enguias se verificou um aumento muito grande da concentração de ambos os compostos (entre T0 e T1) e o início da sua diminuição (de T1 a T7). A partir do tempo T7 a concentração de ambos os compostos, tanto nas enguias como na água foi diminuindo até ao décimo quarto dia (final do ensaio).



**Figura 2. 13:** Concentração de (A) *galaxolide* e (B) *tonalide* nas enguias de vidro e água do aquário ao longo do tempo de ensaio e um zoom das mesmas concentrações na água do aquário.

### 2.3.2.3.3. Factor de Bioconcentração (FBC)

O factor de bioconcentração caracteriza-se pela relação entre a concentração de uma dada substância nos tecidos dos organismos e a concentração dessa mesma substância no meio em que estão inseridos.

Foi calculado o factor de bioconcentração, com a concentração do analito encontrado na enguia de vidro e a mesma concentração encontrada na água do aquário, os resultados encontram-se na tabela 2.17.

**Tabela 2. 17:** Factor de bioconcentração do *galaxolide* e *tonalide* nas enguias de vidro.

Analito	T0	T1	T7	T14
HHCB	2	124	205	220
AHTN	4	197	737	351

Um composto é considerado potencialmente bioacumulável se o respectivo factor de bioconcentração (FBC) for superior a 100 (Lextec, 2014). Os resultados vêm comprovar que os compostos analisados são bioacumuláveis, uma vez que se obtiveram valores entre 124 e 737, com a excepção do T0, período em que se adicionou a concentração conhecida, este valor pode justificar-se pela falta de tempo que o composto teve em passar da água para o organismo.

### 2.3.2.4. Efeito de Matriz

O efeito de matriz (ME%) é um parâmetro que permite o estudo de selectividade que objectiva avaliar possíveis interferências causadas pela matriz, que podem levar a fenómenos de diminuição ou aumento do sinal (Kwon et al., 2012).

A fórmula usada para o cálculo do efeito de matriz é a seguinte:

$$ME(\%) = 100 \times \left( 1 - \frac{S_m}{S_{MQ}} \right)$$

Sendo que:

$S_m$  – representa o declive da recta de calibração com a adição do padrão

$S_{MQ}$  – representa o declive da recta de calibração procedural.

Não se observa efeito de matriz quando Sm e SMQ são semelhantes e por isso o ME (%) é próximo de zero. Se se verificar uma supressão de sinais intensa, devido à presença da matriz, o valor de Sm é baixo e o ME (%) é próximo de 100%. No caso do aumento do sinal, Sm é elevado comparando com o SMQ e portanto o ME (%) é negativo (Cavalheiro, 2014)

Na tabela 2.18 encontram-se os resultados do cálculo do efeito de matriz em percentagem para as várias amostras analisadas.

**Tabela 2. 18:** Cálculo do efeito de matriz (%) para as diferentes amostras analisadas.

Analito	Efeito matriz (%)				Enguia de Vidro
	Ostra e Mexilhão	Salmão Músculo	Salmão Fígado	Salmão Gónadas	
ADBI	53	64	74	57	97
AHMI	38	2	47	52	56
ATII	15	7	44	19	73
HHCB	31	34	63	46	37
AHTN	33	24	58	40	28
MK	-34	-43	13	-17	-19
MX	10	-2	33	18	11

Os valores calculados para o ADBI são semelhantes para todas as matrizes, excepto para as enguias de vidro, com uma percentagem próxima de 100. O mesmo é visto para o composto ATII. O AHMI exibiu um efeito de matriz menor para o salmão músculo. O HHCB e AHTN parecem ter comportamento lipofílico semelhante, uma vez que apresentam maior efeito da matriz no salmão fígado, salmão gónadas e enguia de vidro. MK e MX mostram que o efeito de matriz é mais elevado nas amostras de salmão fígado, comprovando mais uma vez o carácter lipofílico dos *musks*, uma vez que entre as várias amostras, o fígado é a amostra com maior quantidade de gordura.

## Conclusão e Perspectivas Futuras

Com a realização deste trabalho foi possível avaliar o grau de contaminação de diversos produtos alimentares com contaminantes inorgânicos (capítulo 1) e orgânicos (capítulo 2).

No primeiro capítulo foi possível concluir que o teor em metais pesado dos produtos hortícolas nas duas populações em estudo foi de um modo geral baixo para colocar em risco a população. Contudo, os resultados da análise de risco efectuada têm de ser interpretados com prudência uma vez que os produtos hortícolas não são a única fonte de exposição aos metais pesados. Com efeito, alimentos como a carne, o peixe ou os cereais, assim como a água podem, igualmente, constituir importantes fontes de exposição alimentar a estes contaminantes. O estudo da contaminação de uma gama mais alargada de produtos alimentares seria então importante para se poder efectuar uma análise de risco mais robusta.

De todos os metais estudados o único que apresentou situações de risco, apenas no pior dos cenários, foi o arsénio, sendo identificado o grupo das crianças como o principal grupo de risco. Também aqui os resultados podem ainda ser superiores se se considerarem todas as outras possíveis fontes alimentares de arsénio. Neste contexto, seria também muito relevante efectuar a especiação do arsénio encontrado nos vários alimentos, uma vez que isso não foi feito, e é importante porque este elemento pode encontrar-se em diferentes formas, que possuem graus de toxicidade muito distintos.

Igualmente seria muito vantajoso alargar esta análise a outras zonas, quer urbanas quer rurais, em que muitas vezes o uso de pesticidas e de adubos pode ser efectuada de forma menos criteriosa podendo, assim, contribuir para o aumento da concentrações de metais pesados nos solos e nos produtos alimentares.

No capítulo 2 foi possível verificar a existência de contaminação com *musks* sintéticos, especialmente com *galaxolide* e *tonalide* nas amostras alimentares analisadas. Contudo, a análise ao longo do tempo indicou uma tendência de melhoria desta situação. Dado o potencial de bioacumulação destes compostos e a sua toxicidade associada, especialmente os seus efeitos de desregulação endócrina, a sua monitorização em matrizes alimentares reveste-se da maior importância. Em trabalhos futuros seria importante alargar a amostragem a outras matrizes e a outros locais de forma a ter uma melhor perspectiva da situação presente. Seria, igualmente, importante continuar a investigar mais sobre os metabolitos que resultam destes compostos e o seu grau de toxicidade e ecotoxicidade. Isto porque da metabolização dos *musks* sintéticos podem resultar metabolitos mais tóxicos que os compostos originais. Seria também relevante, e uma vez que diariamente estamos sujeitos a estes compostos, realizar-se uma avaliação de risco da exposição a *musks* sintéticos no organismo humano.

## Referências

- Adamsa, M.L., Zhao, F.J., McGratha, S.P., Nicholsonb, F.A., Chambersb, B.J., 2004. Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties. *J. Environ. Qual.*, (33), 532–541.
- Adriano, D.C., 2003. *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals*. Springer, New York, USA, 2nd edition.
- AFSSA, 2008b. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'informations générales sur la toxicité du Nickel dans la chaîne alimentaire. Maisons-Alfort, France. Disponível: <https://www.anses.fr/fr/search/site/NIKEL?iso1=fr&iso2=en> (Acedido: 14-07-2014 09:15).
- Ammann, A.A., 2007. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *J. Mass. Spect.*, (42), 419–427.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Shenk, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, (86), 412.
- Ángel, D.M, Peña-Álvarez, A., Villalobos, M., 2013. Application of Programmed Temperature Vaporization Large Volume Injection Gas Chromatography (PTV-LVI-GC) to the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soils. *J. Mex. Chem. Soc.*, (57), 2, 85-91.
- ATSDR, 1994. Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Copper <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf> (Acedido: 18-08-2014 12:00).
- ATSDR, 2014. Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Strontium. <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=120> (Acedido: 28-08-2014 15:45).
- Badawy, S.H., Helal, M.I.D., Chaudri, A.M., Lawlor, K., McGrath, S.P., 2002. Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. *J. of Environmental Quality*. (31), 162–167.
- Barra, C., Santelli, R., Abrão, J.J., Guardia, M., 2000. *Especiação de Arsénio – Uma revisão*, *Química Nova*, 23, 1.
- Bester, K., 2009. Analysis of musk fragrances in environmental samples. *J. of Chromatography A*, (1216), 470-480.
- Bigdeli, M., Seilsepour, M., 2008. Investigation of metals accumulation in some vegetables irrigated with wastewater in Shahre Rey-Iran and toxicological implication. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, (4), 86 – 92.
- Caeiro, S., 2013. PTDC/SAU-ESA/100107/2008 HERA - Environmental Risk Assessment of a contaminated estuarine environment: A case study. Disponível: <http://www.fct.pt/apoios/projectos/> (Acedido: 09-07-2014 17:45).
- Calderon, J., Ortiz-Perez, D., Yanez, L., Diaz-Barriga, F., 2003. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotox. and Environ. Saf.*, (56), 1, 93–103.



Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health), 2007. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment,. Publication n.º 1299. Disponível: [http://www.esdat.net/EnvironmentalStandards/Canada/SOIL/rev\\_soil\\_.pdf](http://www.esdat.net/EnvironmentalStandards/Canada/SOIL/rev_soil_.pdf) (Acedido: 22-07-2014 21:30).

Cavalheiro, J., Prieto, A., Zuloaga, O., Preudhomme, H., Amouroux, D., Monperrus, M., 2014. Evaluation of a solid phase extraction method in the analysis of polycyclic musks in whole-water samples. *Analyt. Chim. Acta*, (773), 68-75.

Chase, D.A, Karnjanapiboonwong, A., Fang, Y., Cobb, G.P, Morse, A.N., Anderson, T.A., 2012. Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments. *Scien.of the Total Environment*, (416), 253–260

ChemSpider, 2014. Disponível : <http://www.chemspider.com/> (Acedido: 14-08-2014 17:15)

Chojnacha, K., Chojnacki, A., Gorecka, H., Gorecki, H., 2005. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci. Total Environ.*, (337), 175 – 182.

Cieřlik, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J.M., Surma-Zadora, M., 2011. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry*, (125), 2, 773–778.

Codex Alimentarius, 2012. Recommended methods of analysis and sampling, 234-1999.

Cui, Y.J., Zhu, Y.G., Zhai, R.H., Chen, D.Y., Huang, Y.Z., Qiu, Y., Ling, J.Z., 2004. Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Naning, China. *Environ. Internat.*, 785-791.

Davydova S., 2005. Heavy metals as toxicants in big cities. *Microchem. J.*, (79), 1-2, 133–136.

Decreto Lei n.º 306/2007, estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano. Diário da República, I SÉRIE, N.º 164 de 27 de Agosto de 2007, 5747- 5765. Disponível: <http://dre.pt/pdf1s/2007/08/16400/0574705765.pdf> (Acedido: 07-07-2014 09:30).

Decreto-Lei nº 189/2008 de 24 de setembro 2008, Diário da República, série I, 189, 6826-6908. Disponível: <http://www.dre.pt/pdf1s/2008/09/18500/0682606905.pdf> (Acedido: 15-08-2014 15:45).

Decreto-Lei nº 236/98, que define os requisitos a observar na utilização das águas para rega. Diário da República, I SÉRIE-A, N.º 176 de 1 de Agosto de 1998, 3676- 3722. Disponível: <http://dre.pt/pdf1s/1998/08/176A00/36763722.pdf> (Acedido: 15-07-2014 16:40).

DeLafuente, M.A., Juarez M., 1995. Determination of phosphorus in dairy-products by sample wet digestion in a microwave-oven. *Analyt. Chimica Acta*, (309), 355 – 359.

Demesmay, C., Olle, M., Porthault, M., 1994. Arsenic speciation by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. of Analyt. Chem.*, (348),3, 205-210.

Directiva 2003/40/CE da comissão de 16 de Maio de 2003. estabelece a lista, os limites de concentração e as menções constantes do rótulo para os constituintes das águas minerais naturais, bem como as condições de utilização de ar enriquecido em ozono para o tratamento das águas minerais naturais e das águas de nascente. Disponível: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriSer> (Acedido: 07-07-2014 09:30).

Duedahl-Olesen, L., Cederberg, T., Pedersen, K.H., Hojgard, A., 1999. Synthetic musk fragrances in trout from Danish fish farms and human milk. *Chemosph.*, (61),422–431.

EFSA, 2003. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Copper. Disponível: <http://www.efsa.europa.eu/en/Copper.en.pdf> (Acedido: 14-07-2014 09:30).

EFSA, 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Disponível: <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf> (Acedido: 14-07-2014 11:00).

EFSA, 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Disponível: <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatolerableuil.pdf> (Acedido: 18-07-2012 10:00)

EFSA, 2009b. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Chromium picolinate, zinc picolinate and zinc picolinate dihydrate added for nutritional purposes in food supplements. EFSA, Parma, Italy. Disponível: [http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/ans\\_ej1113\\_Chromium\\_picolinate\\_op\\_en.pdf](http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/ans_ej1113_Chromium_picolinate_op_en.pdf) (Acedido: 21-07-2014 10:10).

EFSA, 2010. Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA, Parma, Italy. Disponível: <http://www.efsa.europa.eu/fr/search/doc/1570.pdf> (Acedido: 17-08-2014 10:00).

EPA, 2014a. Organic and inorganic contaminants. Disponível: <http://epa.gov/organiccontaminants> (Acedido: 22-07-2014 10:40).

EPA, 2014b. Radiation Protection – Strontium. Disponível: <http://www.epa.gov/radiation/radionuclides/strontium.html> (Acedido: 27-08-2014 09:45).

European Commission, 2008. European Risk Assessment Report, Final draft for submission to SCHER, HHCB, CAS no: 1222-05-5, EINECS no. 214-946-9 <http://echa.europa.eu/documents/10162/947def3b-bbbf-473b-bc19-3bda7a8da910> (Acedido: 02-09-2014 09:30).

FAO, 2014. Statistics Division, Food and Agriculture: Production\_Crops. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Acedida: 15-08-2014 16:30).

FDA, 2001. Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Report of the Panel on Micronutrients. National Academy Press, Washington, Food and Drug Administration, Dietary supplements, *Center for Food Safety and Applied Nutrition*. Disponível: [http://70.89.103.33/bota/USDA/10026\\_EXS.pdf](http://70.89.103.33/bota/USDA/10026_EXS.pdf) (Acedido: 16-12-2013 15:45).

Fernández-González, V., Concha, G.E., Muniategui, L.S., López, M.P., Prada, R.D., 2008. A multivariate study of the programmed temperature vaporization injection-gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons: Application to marine sediments analysis. *J. Talanta*, (74), 1096-1103.

Ferner, D.J., 2001. Toxicity heavy metals, *J. eMedicine*, (2),1.

Flyvholm, M.A, Nielsen, G.D., Andersen, A., 1984. Nickel content of food and estimation of dietary intake. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, (179), 6, 427-431.

- Foster, L.H., Sumar, S., 1997. Selenium in health and disease: a review, *Critical Reviews in Food Sci. and Nutri.*, (37), 211–228.
- Fromme, H., Otto, T., Pilz, K., 2001. Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Res.*, (35), 121–128.
- García, M.A., Alonso, J., Melgar, M.J., 2009. Lead in edible mushrooms: levels and bioaccumulation factors. *J. of Hazardous Material*, (167), 1–3, 777–783.
- Gatermann, R., Hellou, J., Hühnerfuss, H., Rimkus, G., Zitko, V., 1999. Polycyclic and nitro musks in the environment: a comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere*, (38), 3431-3441.
- Gebrekidan, A., Weldegebriel, Y., Hadera, A., Bruggen, B., 2013. Toxicological assessment of heavy metals accumulated in vegetables and fruits grown in Ginfel river near Sheba Tannery, Tigray, Northern Ethiopia. *Ecotox. and Environ. Safety*, (95), 171 – 178.
- Gerhard M., Wolfgang S., Alexander H., Alfred S., Peer R., 1997. Fast on-site GC/MS analysis of hazardous compound emissions from fires and chemical accidents. *Field Analyt. Chem. & Techn.*, (1), 4, 181–194.
- Geyer, H.J., Rimkus, G.G., Scheunert, I., Kaune, A., Schramm, K.W., Kettrup, A., Zeeman, M., Muir, D.C., Hansen, L.G., Mackay, D., 2000. Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs) and other organic compounds in fish and other organisms including humans. *The handbook of environmental chemistry*, (2).
- Gopalani, M., Shahare, M., Ramteke, D.S., Ware, S.R., 2007. Heavy metal content of potato chips and biscuits from Nagpur city, India. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, (79), 384-387.
- Gupta, U., Gupta, S., 1998. Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: implications for management. *Commun. Soil. Sci.Plant Anal.*, (29) 1491–1522.
- Harmanescu, M., Alda, L.M., Bordean, D.M., Gogoasa, I., Gergen I., 2011. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. *Chem, Cent. J.*, (5), 64.
- Hoh, E., Mastovska, K., 2008. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, (1186), 2-15.
- IAEA, 2014. International Atomic Energy Agency. Frequently Asked Chernobyl Questions. Disponível: <http://www.iaea.org/newscenter/features/chernobyl-15/chno-faq.shtml> (Acedido: 28-08-2014 16:00).
- IARC, 2014. Agents Classified by the IARC Monographs, (1–110). Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf> (Acedido: 22-08-2014 10:30).
- Institute of medicine, 2002, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Disponível: [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=10026&page=442](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10026&page=442) (Acedido: 19-08-2012 19:30).

- Itanna, F., 2002. Metals in leafy vegetables grown in Adis Ababa and toxicological implications, *Ethiop. J. Health Dev.*, (16), 295 – 302.
- Jarup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, (68), 167–182.
- JECFA, 2011b. Evaluation of certain food additives and contaminants. 73rd report of the joint FAO/WHO expert committee on food additive. WHO Technical Report Series 960. Disponível: [http://whqlibdoc.who.int/trs/who\\_trs\\_960\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_960_eng.pdf) (Acedido: 23-08-2012 10:15).
- Jeroen, C.B., Hans, G.J., 1996. Large-volume injection in capillary gas chromatography using a programmed-temperature vaporizing injector in the on-column or solvent-vent injection mode. *J. Chromatogr. A*, (724), 384-391.
- Jolly, Y.N., Islam, A., Akbar, S., 2013. Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment. *SpringerPlus*, (2), 385.
- Kallenborn, R., Gatermann, R., Rimkus, G.G., 1999. Synthetic musks in environmental samples: indicator compounds with relevant properties for environmental monitoring. *J. Environ. Monit.*, (4), 70N-74N.
- Kannan, K., Reiner, J.L., Yun, S.H., Perrotta, E.E., Tao, L., Johnson, R.B., Rodan, B.D., 2005. Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *J. Chemosphere.*, (61), 693–700.
- Kannan, K., Reiner, J.L., Yun, S.H., Perrotta, E.E., Tao, L., Restrepo, B.J., Rodan, B.D., 2005. Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *J. Chemosphere*, (61), 693-700
- Khairiah, T., Zalifah, M.K., Yin, Y.H., Aminah, A., 2004. The uptake of heavy metals by fruit type vegetables grown in selected agricultural areas. *J. Biol. Sci.*, (8), 1438 – 1442
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G. , 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ. Pollut.*, (152), 3, 686–692.
- Kirpichtchikova, T.A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M.A. & Jacquet, T., 2006. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, (70), 9, 2163–2190.
- Kohlmeier, M., 2003. Chromium. *Nutrient Metabolism - Food Science and Technology*, 742–745
- Krishna, A.K., Govil, P.K., 2007. Soil contamination due to heavy metals from an industrial area of Surat, Gujarat, Western India. *Environ. Monit. Assess.*, (124), 263 – 275
- Kucharski, R., Marchwińska, E., Gzyl, J., 1994. Agricultural policy in polluted areas. *Ecolog. Engineering.*, (3), 3, 299–312.
- Kwonet, H., Lehotay, S. J., Geis-Asteggianti, L., 2012. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *J. of Chromatography A*, (1270), 28, 235–245.

- Lasat, M.M., 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J. of Hazardous Substances Research*, (2), 1–25.
- Leblanc, J.C., Guerin, T., Noel, L., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.L., Verger, P., 2005. Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French total diet study. *Food Additives and Contaminants*, (22), 624–641.
- Lextec, 2014. Definição de factor de bioconcentração. Disponível: [http://www.instituto-camoes.pt/lextec/por/domain\\_1/definicao/20736.html](http://www.instituto-camoes.pt/lextec/por/domain_1/definicao/20736.html) (Acedido: 22-08-2012 17:30).
- Lima, E.C., Barbosa, F., Krug, F.J., Silva, M.M., Vale, M.G., 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. of Analytical and Atomic Spectrometry*, (15), 995–1000.
- Linder, C., Azam, M.H., 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *J.Clin. Nutr.*, (63) 797S – 811S.
- Liu, J., Goyer, R.A., Waalkes, M.P., 2008. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.) Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 7ª Edição, *Medical Publishing Division, New York*, 931-979.
- Lönnerdal, B., Jayawickrama, L., Lien, E.L., 1999. Effect of reducing the phytate content and of partially hydrolyzing the protein in soy formula on zinc and copper absorption and status in infant rhesus monkeys and rat pups. *Am. J. Clin. Nutr.*, (69), 490–496.
- Luo, C.L., Liu, C.P., Wang, Y., Liu, X., Li, F.B., Zhang, C., Li, X.D., 2011. Heavy metal contamination in soils and vegetables near an e-waste processing site, south China. *J. of Hazardous Materials*, (186), 1, 481–490.
- Ma, H.W., Hung, M.L., Chen, P.C., 2006. A systemic health risk assessment for the chromium cycle in Taiwan. *Environ. Int.*, (10), 1016.
- McBride, M., 2003. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks?. *Advances in Environmental Research*, (8), 1, 5–19.
- McBride, M., Sauve, S., Hendershot, W., 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European J. of Soil Science*, (48), 2, 337–346.
- McLaughlin, M.J., Parker, D.R., Clarke, J.M., 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research*, (60), 1, 143–163.
- McLaughlin, M.J., Parker, D.R., Clarke, J.M., 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Res.*, (60), 143-163.
- McLaughlin, M.J., Smolders, E., Degryse, L.E., Rietra, R., 2011. Uptake of metals from soil into vegetables\_Dealing with contaminated sites: from theory towards practical application. *F.A Swartjes (ed.)*, (8), 325-367.
- Melgar, M.J., Alonso, J., García, M.A., 2009. Mercury in edible mushrooms and underlying soil: bioconcentration factors and toxicological risk. *Science of the Total Environment*, (407), 20, 5328–5334.

Monperrus, M., 2012. Orque Sudoe - SOE3/P2/F591. Oyster and Mussel samples: analytical data treatment. Disponível: <http://www.interreg-sudoe.eu/ORQUE-SUDOE/> (Acedido: 06-08-2014 16:00).

Müller, M., Anke, M., 1994. Distribution of cadmium in the food chain (soil-plant-human) of a cadmium exposed area and the health risks of the general population. *Science of the Total Environment*, (156), 2, 151–158.

Nabulo, G., Black, C.R., Young, S.D., 2011, Trace metal uptake by tropical vegetables grown on soil amended with urban sewage sludge. *Environ. Pollut.*, (159), 368 – 376.

Nakata H., 2005. Occurrence of synthetic musk fragrances in marine mammals and sharks from Japanese coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* (39), 3430–3434.

Nakata, H., Sasaki, H., Takemura, A., Yoshioka, M., Tanabe, S., Kannan, K., 2007. Bioaccumulation, temporal trend and geographical distribution of synthetic musks in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.*, (41), 2216-2222.

Nan, Z., Li, J., Chen, F., Sun, W., 2002. Relations between soil properties and elected heavy metal concentrations in spring wheat (*Triticumaestivum* L.) grown in contaminated soils. *J. Water, Air, Soil Pollut*, (133), 205–213.

Nardi, E.P., Evagelista, F.S., Tornem, L., Saint’Pierre, D.T., Curtius, A.J., Souzaa, S.S., Barbosa, F., 2009. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, (112), 727 – 732.

NCM - Nordic Council of Ministers, 2003. Cadmium Reviews. Disponível: [http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr\\_cadmium.pdf](http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf) (Acedido: 05-09-2014 15:15).

Nielsen, S. P., 2004. The biological role of strontium. *Bone*, (35), 3, 583–588

NIST Chemistry WebBook, 2014. Disponível: <http://webbook.nist.gov/> (Acedido: 14-08-2014 17:30).

Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA), 2010. DRAFT - Public Health Goal for Hexavalent Chromium in Drinking Water. Disponível: <http://www.oehha.ca.gov/Prop65/law/071511Cr6.html> (Acedido: 12-08-2014 15:30).

OMS e JECFA, 1982. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Who Food Additives, Series 17. Disponível: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je01.htm> (Acedido: 23-08-2012 11:15).

OMS, 1993. Guidelines for Drinking Water Quality, (1), Geneva. Disponível: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/2edvol1i.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/2edvol1i.pdf) (Acedido: 08-07-2014 16:00)

OMS, 2005. Nickel in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinkingwater Quality. Disponível: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/gdwqrevision/nickel2005.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/nickel2005.pdf) (Acedido: 21-07-2014 15:00).



- OMS, 2014. Food Security. <http://www.who.int/trade/glossary/story028/en/#> (Acedido: 22-07-2014 10:40).
- Ortolani, S., Vai, S., 2006. Strontium ranelate: an increased bone quality leading to vertebral antifracture efficacy at all stages., *Bone*, (38), 19-22.
- Osemwengiea, L.I., Steinberg, S., 2001. On-site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra-trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography–mass spectrometry in the full-scan mode. *J. of Chromatography A*, (932), 107–118.
- Oves, M., Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E., 2012. Soil contamination, nutritive value and human health risk assessment of heavy metals: an overview. *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*, 1 – 27.
- Paolo, L., Deborah, P., Natale, G. F., Oscar N., 2012. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, (5), 127- 164.
- Parsons, P.J., Barbosa, F., 2007. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine, *Spectrochimica Acta, Part B*, (62) 992 – 1003.
- Pedersen, S., Selcka, H., Salvitob, D., Forbes, V., 2009. Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (72), 4, 1190–1199.
- Prentice, A., 1993. Does mild zinc deficiency contribute to poor growth performance?. *Nutr.Rev.*, (5), 268.
- Ramadan, M., Al-Ashkar, E., 2007. The effect of different fertilizers on the heavy metals in soil and tomato plant. *Australian J. of Basic and Applied.*, (1), 300–306.
- Ramskov, T., Selck, H., Salvito, D., Forbes, V.E., 2009. Individual- and population-level effects of the synthetic musk, HHCB, on the deposit-feeding polychaete, *Capitella* sp. I. *Environ.Toxicol. Chem.*, (28), 2695–705.
- Regulamento (CE) nº 1881/2006 de 19 Dezembro 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal*, (364), 5. Disponível: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/> (Acedido: 22-07-2014 11:00)
- Regulamento (CE) nº 315/93 de 19 Dezembro 1993. Laying down Community procedures for contaminants in food. Disponível: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN> (Acedido: 22-07-2014 14:30)
- Reiner, J.L., Kannan, K., 2011. Polycyclic musks in water, sediment and fishes from the upper Hudson river, New York, USA. *Water Air Soil Pollut.*, (241), 335-342.
- Reiner, J.L., Wong, C.M., Arcaro, K.F., Kannan, K., 2007. Synthetic musk fragrances in human milk from the United States. *Environ. Sci.e and Tecn.*, (41), 3815-3820.
- Rimkus G.G., 1999. Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters*, (111), 37-56.

Rodriguez, I.B., Raber, G., Goessler, W., 2009. Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chemistry*, (112), 4, 1084–1087.

Roychowdhury, T., Tokunaga, H., Ando, M., 2003. Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Sci. of the Total Environment*, (308), 1-3, 15–35.

Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., Paoli, T., 2000. Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research*, (20) 737–755.

Sathawara, N.G., Parikh, D.J., Agarwal, Y.K., 2004. Essential heavy metals in environmental samples from Western India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, (73), 756 – 761

SCF, 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. European Food Safety Authority. Disponível: <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf> (Acedido: 13-07-2014 16:30).

Schiavone, A., Kannan, K., Horri, Y., Focardi, S., Corsolini, S., 2010. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated naphthalenes and polycyclic musks in human fat from Italy: Comparison to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Environmental Pollution*, (58), 599-606.

Singh, A., Sharma, R.K., Agrawal, M., Marshall, F.M., 2010. Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *J. Trop. Ecol.*, (51), 375 –387.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2007. Principles of instrumental analysis. Edition 6. ISBN-13: 978-0495012016

Speir, T.W., Schaik, A.P., Percival, H.J., Close, M.E, Pang, L.P., 2003. Heavy metals in soil, plants and groundwater following high-rate sewage sludge application to land. *Water, Air, and Soil Pollution*, (150), 319–358.

Stalikas, C.D., Chaidou, C.I., Pilidis, G.A., 1997. Enrichment of PAHs and heavy metals in soils in the vicinity of the lignite-fired power plants of West Macedonia (Greece). *Sci. of the Total Environ.* (204), 2, 135–146.

Sumner, M.E., 2000. Beneficial use of effluents, wastes and biosolids. *Communications in Soil Sci. and Plant Anal.*, (31), 11–14, 1701–1715.

Swartjes, F.A., Breemen, E.M., Otte, P.F., Beelen, P.V., Rikken, M.G., Tuinstra, J., 2007. Human health risks due to consumption of vegetables from contaminated sites. *Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment*, RIVM report 711701040, 2-130.

SWECO Environment, 2010. Screening of musk substances and metabolites. Disponível: <http://www3.ivl.se/miljo/projekt/dvss/pdf/Muskamnen2009.pdf> (Acedido: 15-08-2014 13:30).



Tapiero, H., Townsendb, D.M., Tewb, K.D., 2003. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper, Biomedicine & Pharmacotherapy*, (57), 9, 386–398.

TDS, 2011. Second French Total Diet Study Report 1 - Inorganic contaminants, minerals, persistent organic pollutants, mycotoxins and phytoestrogens. Disponível: <http://www.tds-exposure.eu/sites/default/files/WP1/RapportEAT2EN1.pdf> (Acedido: 03-07-2014 11:15).

Tembo, B., Sichilongo, K., Cernak, J., 2006. Distribution of copper, lead, cadmium and zinc concentrations in soils around Kabwe town in Zambia. *Chemosphere*. (63), 3, 497–501.

Thomson, C.D., 2013. Selenium. *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, 186–192.

Thomson, B., Poms, R., Rose, M., 2012. Incidents and impacts of unwanted chemicals in food and feeds. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, (4), 2, 77–92.

Trichopoulos, D., 1997. Epidemiology of cancer. In: DeVita, V.T. (Ed.), *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Company, Philadelphia, 231–258.

Tudorean, L., Phillips, C.J.C., 2004. Modeling cadmium uptake and accumulation in plants. *Advances in Agronomy*, (84), 121–157.

Turkdogan, M.K., Kilicel, F., Kara, K., Tuncer, I., Uygan, I., 2002. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environ. Toxicol. and Pharma.*, (13), 175 - 179.

Twining, J.R., Payne, T.E., Itakura, T., 2004. Soil–water distribution coefficients and plant transfer factors for <sup>134</sup>Cs, <sup>85</sup>Sr and <sup>65</sup>Zn under field conditions in tropical Australia. *J. of Environmental Radioactivity*, (71), 1, 71–87.

UN - United Nations Environment Programme, 2010. Final review of scientific information on lead. Disponível: [http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead\\_Cadmium](http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium) (Acedido: 08-07-2014 17:30)

Unak, P., Lambrecht, F.Y., Biber, F.Z., Darcan, S., 2007. Iodine measurements by isotopedilution analysis in drinking water in Western Turkey. *J. of radioanalytical and nuclear chemistry*, (273), 649-651.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency, 2005. Human health risk assessment protocol for hazardous waste combustion facilities. Disponível: [http://www.epa.gov/region6/6pd/rcra\\_c/protocol/protocol.htm](http://www.epa.gov/region6/6pd/rcra_c/protocol/protocol.htm) (Acedido: 25-07-2014 17:30).

Wang, G., Su, M.Y., Chen, Y.H., Lin, F.F., Luo, D., Gao, S.F., 2006b. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environ. Pollution.*, (144), 1, 127–135.

Wang, L.X., Guo, Z.H., Xiao, X.Y., Chen, T.B., Liao, X.Y., Song, J., 2008. Heavy metal pollution of soils and vegetables in the midstream and downstream of the Xiangjiang River, Hunan Province. *J. of Geographical Sciences*, (18), 3, 353–362.

Waters, 2014. Disponível: [http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=pt\\_PT](http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=pt_PT) (Acedido: 05-08-2014 16:30)

Whatmuff, M.S., 2002. Applying biosolids to acid soil in New South Wales: are guideline soil metal limits from other countries appropriate?. *Aust. J. Soil. Res.*, (40), 1041–1056.

Wilkowska, A., Biziuk, M., 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, (125), 3, 803–812.

Wu, S.F., Liu, L.L., Ding, W.H., 2012. One-step microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the rapid determination of synthetic polycyclic musks in oyster by gas chromatography-mass spectrometry. *Food chemistry*, (133), 513-517

Xie, Z.M., Li, J., Chen, J.J., Wu, W.H., 2006. Study on guidelines for health risk to heavy metals in vegetable plantation soils in China. *Asian J. of Ecotoxicolog.* (1), 2, 172–179.

Yamamoto, L.G., 2013. Risks and management of radiation exposure. *Pediatr Emerg Care.*, (29), 9, 1016-1026.

Zaidi, M., Asrar, A., Mansoor, A., Farooqui, M., 2005. The heavy metal concentrations along roadside trees of Quetta and its effects on public health. *J. Appl. Sci.*, (5), 708-711.

Zhang, M.K., Liu, Z.Y., Wang, H., 2010. Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (41), 7, 820–831.

Zheng, N., Wang, Q., Zheng, D., 2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc plant in China via consumption of vegetables. *Sci. of the total environment*, (383), 81-89.

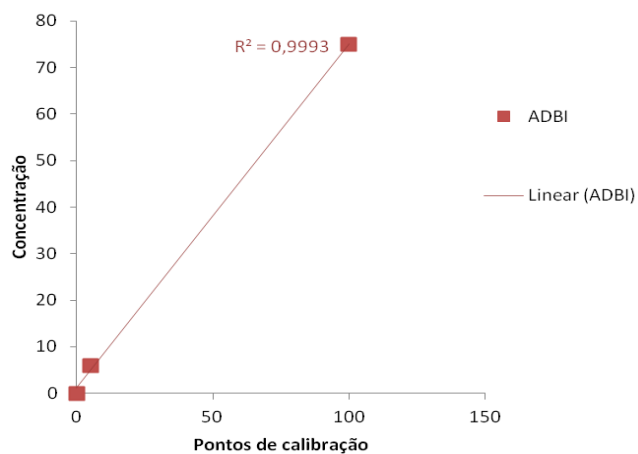
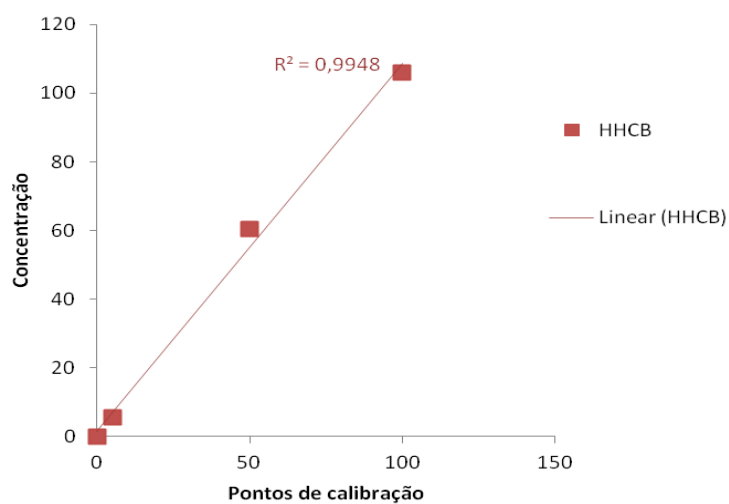
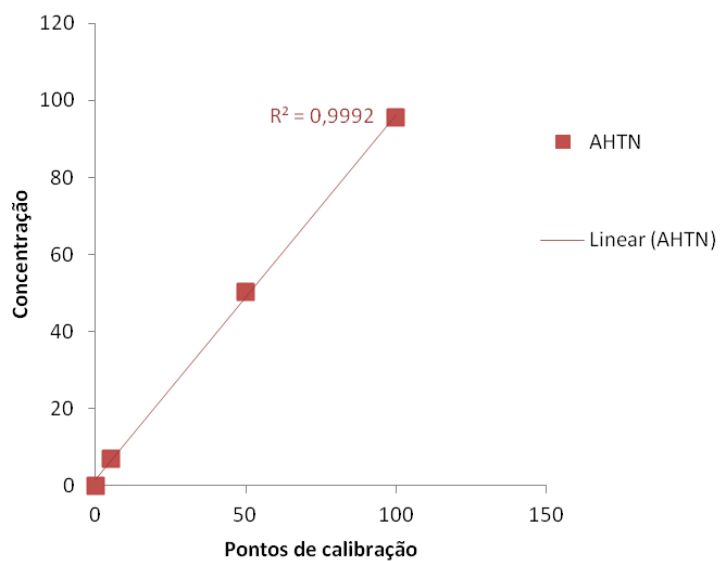
Zhu, F., Fan, W., Wang, X., Qu, L., Yao, S., 2011. Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. *Food and Chemical Toxicology*, (49), 3081-3085

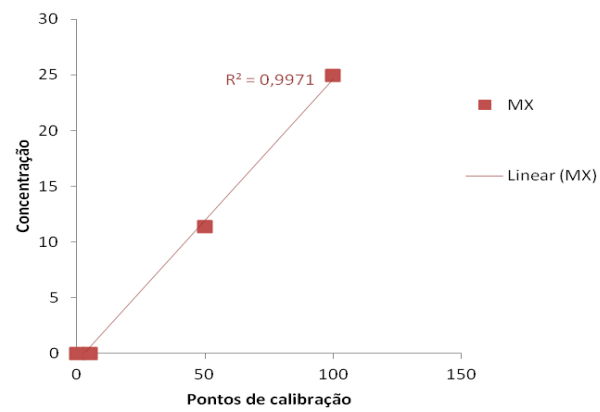
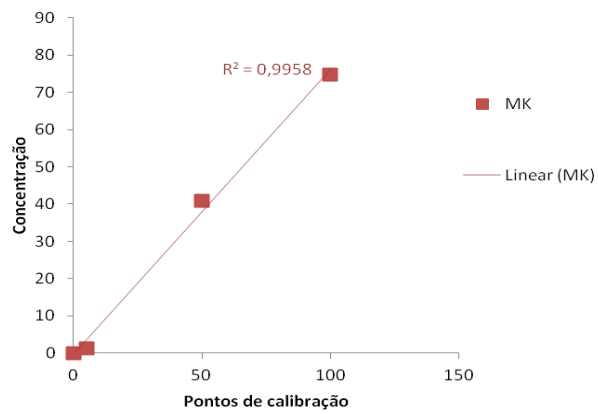
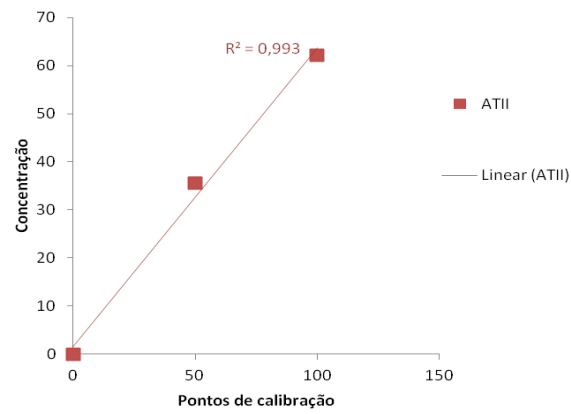
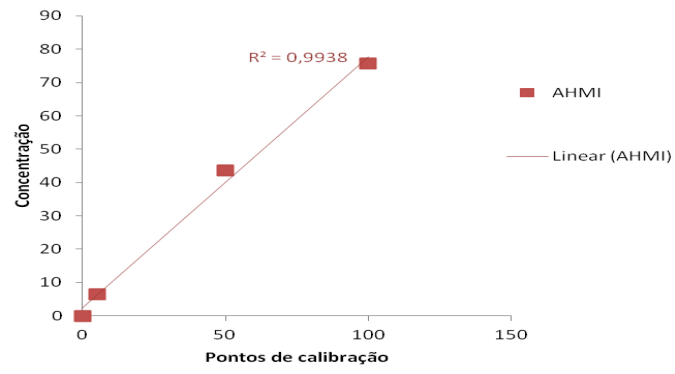
Zhuang P., Zou H., Shu W., 2009. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study. *J. Environmental Sciences*, (21), 849-853.

Zurera-Cosano, G., Moreno-Rojas, R., Salmeron-Egea, J., Pozo, L.R., 1984. Heavy metal uptake from greenhouse border soils for edible vegetables. *J. Sci. Food Agric.* (49), 3, 307-314.

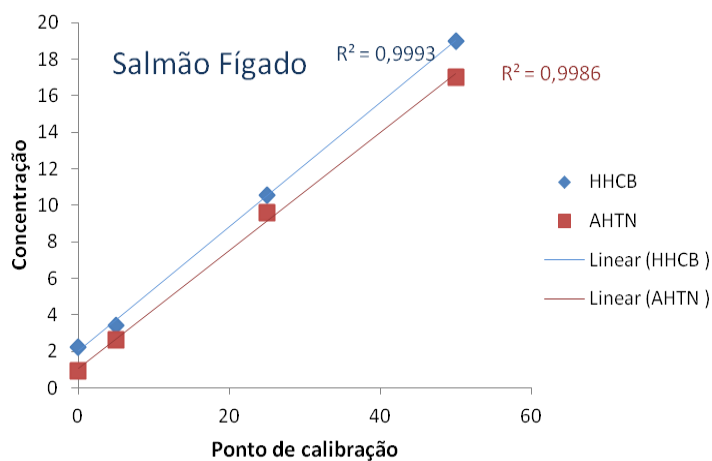
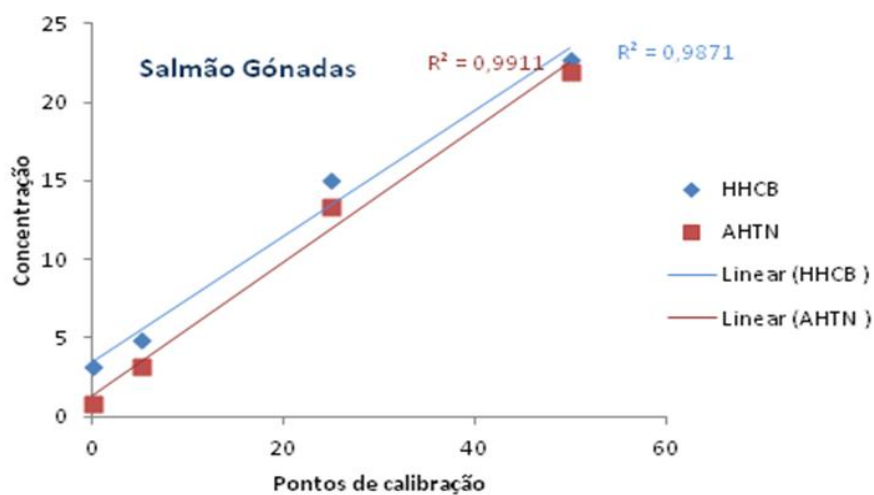
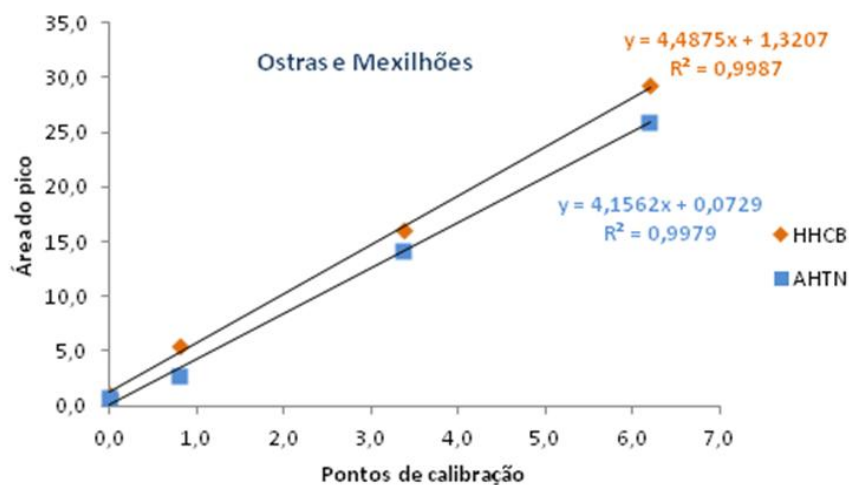
# Anexo I

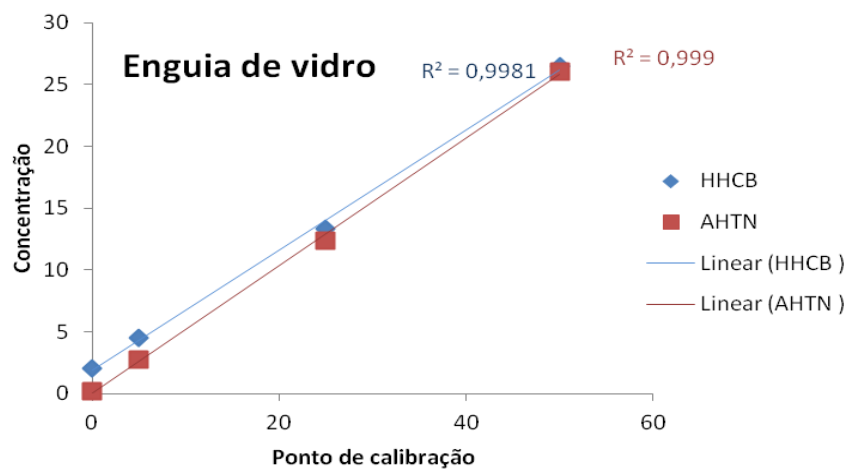
Para se garantir uma qualidade das análises foi necessário a construção de uma calibração instrumental, com um  $R^2$  próximo de 1. A calibração instrumental usada está representada a seguir para os vários elementos analisados:





Para o cálculo da concentração real do composto nas amostras foi necessário usar o declive da calibração com adição de padrão. Os  $R^2$  estão presentes nos gráficos abaixo para as diferentes amostras.





Os limites de detecção do método (MDL) foram calculados recorrendo a réplicas de brancos procedimentais. Os resultados obtidos encontram-se na tabela abaixo:

Analito	Declive	MDL (ng/g)
ADBI	2,71	1,5
AHMI	3,59	2,4
ATII	1,65	2,3
HHCB	4,52	3,9
AHTN	4,16	4,1
MM	3,28	1,3
MK	3,60	1,8
MX	1,43	2,6